



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollataja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Rozrodu, Anatomii
i Genomiki Zwierząt

Prof. dr hab. Monika Bugno-Poniewierska

Kraków 06.11.2023

Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollataja w Krakowie

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Gadeckiej p.t. „Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Gadeckiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Bielak-Żmijewskiej, prof. Instytutu Nenckiego w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN.

Problematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej dotyczy charakterystyki zmian struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3. Doktorantka podjęła się przeprowadzenia serii doświadczeń mających na celu weryfikację sformułowanych przez Nią hipotez zakładających że w starzeniu replikacyjnym i przyspieszonym zachodzą różne zmiany modyfikacji histonu H3 oraz że deheterochromatynizacja jest charakterystyczna dla starzenia replikacyjnego.

W związku z tym Pani mgr inż. Agnieszka Gadecka postawiła sobie za zadanie szczegółowe poznanie różnic w strukturze chromatyny, zależnych od typu starzenia poprzez analizę zmian struktury chromatyny oraz ekspresji genów podczas starzenia przyspieszonego i replikacyjnego VSMC, z uwzględnieniem wybranych modyfikacji histonu H3. W pracy zdefiniowano również szczegółowe cele badawcze, do których należało:

- scharakteryzowanie zmian struktury chromatyny w starzeniu replikacyjnym oraz przyspieszonym komórek mięśni gładkich naczyń,

- zidentyfikowanie genów, których obszary chromosomowe różnią się pod względem wzbogacenia wybranych modyfikacji histonu H3; analiza zmian globalnego wzoru trimetylacji lizyny 9 i 4 w zależności od typu starzenia,

- wykonanie analizy profilu transkryptomicznego komórek ulegających starzeniu w sposób replikacyjny i przyspieszony,

- zbadanie udziału białka HP1 α w procesie starzenia replikacyjnego i przyspieszonego,

- porównanie zmian zachodzących w komórkach mięśni gładkich naczyń hodowanych *in vitro* ze zmianami *ex vivo* komórek izolowanych z blaszki miażdżycowej oraz

- analiza wybranych modyfikacji histonów w fibroblastach w celu zweryfikowania uniwersalności zmian towarzyszących różnym typom starzenia.

Główny cel badań oraz cele szczegółowe zostały jasno sformułowane a przeprowadzone badania wniosły nowe wartości do istniejącej wiedzy z zakresu mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia.

Podkreślić należy złożoność i wagę szczegółowych procedur metodycznych pracy, których realizacja wymagała od Doktorantki znajomości najnowszych metod i technik z zakresu biologii molekularnej, transkryptomiki, jak również epigenetyki. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach ocenianej pracy wykazały, iż zarówno w starzeniu przyspieszonym jak i replikacyjnym dochodzi do istotnych zmian w strukturze jądra komórkowego powiązanych ze stopniowym rozluźnieniem chromatyny, a jej najbardziej rozluźniona forma występuje w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Natomiast na powiększenie powierzchni jądra VSMC oraz wzrost jego szerokości może mieć wpływ zarówno zmniejszony poziom białka LMNB1, jak i stopniowe rozluźnienie chromatyny. Ponadto rozluźnienie chromatyny ma związek ze spadkiem poziomu modyfikacji histonu H3, które są charakterystyczne dla heterochromatyny oraz aktywnej transkrypcyjnie chromatyny i występuje niezależnie od typu komórki i bodźca indukującego starzenie. Doktorantka wykazała również, iż spadek acetylacji w VSMC może być, między innymi wynikiem wzrostu aktywności deacetylaz histonów. Ponadto, iż białko heterochromatyny podjednostka alfa pomaga utrzymać stabilną heterochromatynę w młodych komórkach poprzez interakcję z trimetylacją lizyny 9 histonu H3 (H3K9me3), natomiast w trakcie starzenia akumuluje się w ciałkach PML, co może uniemożliwiać ich oddziaływanie. Uzyskane wyniki wykazały również, że HP1 α może odgrywać rolę we wczesnym etapie naprawy uszkodzeń DNA lub w uszkodzeniach nadających się do naprawy poprzez współwystępowanie ze znacznikiem podwójnych uszkodzeń DNA, γ H2AX.

Stwierdzam iż, badania podjęte przez Doktorantkę oraz otrzymane wyniki są nowatorskim, kompleksowym opracowaniem o znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym, spełniającym tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Charakterystyka pracy

Oceniana praca została przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań. Rozprawa ma charakter monografii, liczy 213 stron i zawiera podstawowe rozdziały charakterystyczne dla tego typu publikacji: wstęp, hipotezę i cele badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. W pracy zawarto również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz spis publikacji autorki rozprawy.

Rozprawa doktorska traktuje w sposób pełny i merytorycznie poprawny zagadnienia z zakresu zmian obserwowanych w efekcie procesu starzenia komórkowego. Tytuł rozprawy jest adekwatny do jej treści. Praca jest dobrze zredagowana, a cel badań jest jasny i prawidłowo sformułowany. Na podkreślenie zasługuje również bardzo staranne opracowanie graficzne i wydawnicze przedstawionej do oceny dysertacji.

Wprowadzeniem do pracy jest krótkie, dwustronicowe „Streszczenie” oraz liczący 34 strony maszynopisu „Wstęp” nakreślający problematykę ściśle związaną z hipotezą badawczą i założonymi w pracy celami badań. Został on podzielony na 8 podrozdziałów, w których Pani mgr inż. Agnieszka Gadecka, z wykorzystaniem aktualnych, właściwie dobranych artykułów naukowych, w sposób dojrzały i pełny, przedstawiła problematykę związaną ze zmianami zachodzącymi w starej komórce, omówiła rodzaje i rolę starzenia komórkowego oraz architekturę jądra komórkowego. Ponadto w pięciu pod- podrozdziałach, szczegółowo przedstawiła modyfikacje epigenetyczne DNA i histonów (w tym metylację DNA i potranslacyjne modyfikacje histonów). W syntetyczny, jasny i wyczerpujący sposób Doktorantka omówiła charakterystykę i funkcję białka HP1 α , zmiany w strukturze jądra i chromatyny towarzyszące starzeniu komórkowemu a na koniec zależne od wieku choroby układu krążenia oraz udział starzenia komórkowego w rozwoju miażdżycy.

W rozdziale tym Autorka wykorzystując 302 pozycje piśmiennictwa naukowego, w tym wszystkie prace opublikowane w indeksowanych czasopismach, wykazała się bardzo

dobrą orientacją w omawianej problematyce. Zaznaczyć należy, że bibliografia o szerokim spektrum tematycznym została odpowiednio dobrana do każdego z rozdziałów pracy.

Do rozdziału tego mam jedną uwagę natury merytorycznej:

- w podrozdziale 1.1 na stronie 20 można przeczytać: „Wiele kluczowych zmian towarzyszących starzeniu zachodzi w jądrze komórkowym. Jego rozmiar powiększa się, dochodzi do zaburzeń w budowie otoczki oraz blaszki jądrowej, a zwykle ściśle upakowana chromatyna, nazywana heterochromatyną, ulega rozluźnieniu zmieniając się w euchromatynę.” – stwierdzenie to wydaje się być skrótem myślowym i dlatego proszę Doktorantkę o doprecyzowanie o jaką heterochromatynę konkretnie chodzi.

Poza tym mam drobne uwagi natury redakcyjno – technicznej:

- pomyłka w numeracji ostatniego podrozdziału wstępu, oznaczonego 1.1, co powinno zostać zastąpione 1.8;
- częste błędne użycie dużych liter, zwłaszcza po skrótach zakończonych kropką lub rozpoczęcie zdania z małej litery.

W rozdziale „Hipoteza i cele badawcze” Doktorantka krótko streszcza problematykę pracy wykazując istotę i zasadność podjętych badań wraz z hipotezą badawczą oraz wynikającym z niej ogólnym celem badań, który dodatkowo został uszczegółowiony poprzez zdefiniowanie 6 szczegółowych celów badawczych. Do tego rozdziału nie wnoszę uwag.

Rozdział „Materiał i metody” został opracowany bardzo szczegółowo i starannie. W rozdziale tym bardzo dobrze opisano pochodzenie materiału badawczego, którym były komórki mięśni gładkich naczyń izolowanych z aorty, fibroblastów ludzkich oraz komórki mięśni gładkich pochodzących z blaszek miażdżycowych. Dodatkowo umieszczone zostały trzy tabele z wykazem zastosowanych w badaniach przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych oraz starterów wykorzystanych w analizie qPCR oraz ChIP-seq. Do tej części mam jedynie uwagę techniczną dotyczącą numeracji podrozdziału „Przeciwciała”, który w mojej opinii powinien być odrębnym podrozdziałem tak jak „Startery” a nie ciągłością podrozdziału „Komórki”. W dalszej części rozdziału „Materiał i metody” opisano wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych celów pracy. Procedury badawcze, pomimo ich złożoności, zostały opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie. Opis procedur wzbogacony został również o opracowania tabelaryczne składów mieszanin oraz ryciny przedstawiające sposób interpretacji wyników, co znacząco wpływa na czytelność omawianego rozdziału. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że jakość merytoryczna oraz liczba zastosowanych technik i narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki.

Do rozdziału tego mam pytania dotyczące doprecyzowania opisanych w podrozdziale 3.2.1.2 Starzenie przyspieszone indukowane doksorubicyną oraz w podrozdziale 3.2.1.3 Starzenie przyspieszone indukowane kurkumina – różnic w stężeniach zarówno roztworu doksorubicyny jak i kurkuminy w zależności od hodowli komórek: VSMC i fibroblastów.

W rozdziale pt. „Wyniki i Dyskusja” Doktorantka przedstawiła, w uporządkowany sposób, na 70 stronach maszynopisu, uzyskane rezultaty. Rozdział ten słusznie został podzielony na 4 główne podrozdziały, które dodatkowo podzielono na szczegółowe, tematyczne pod- podrozdziały. Taka konstrukcja czyni pracę czytelną, pomimo zamieszczenia dużej liczby rezultatów. Wyniki zestawiono w 5 tabelach oraz 43, wysokiej klasy rycinach. Układ tabel i rycin jest przejrzysty i komunikatywny. Rozdział ten pokazuje ogrom pracy jaki został włożony w uzyskanie zaprezentowanych wyników. Interpretacja wyników świadczy o należyтым przygotowaniu mgr inż. Agnieszki Gadeckiej do wielowątkowego problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej umożliwiającego pokazanie szerszego obrazu zmian w strukturze chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych zachodzących podczas procesu starzenia. Otrzymane wyniki zostały poddane konstruktywnej krytyce oraz dyskusji w kolejnym rozdziale dysertacji.

Dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący w oparciu o adekwatną do problematyki literaturę. Bezspornym walorem dyskusji jest w mojej ocenie umiejętność krytycznego odniesienia do części uzyskanych wyników świadcząca o dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Agnieszki Gadeckiej.

Po zapoznaniu się z rozdziałami „Wyniki” i „Dyskusja” proszę jedynie o wyjaśnienie jakie przyczyny techniczne uniemożliwiły uzyskanie jednoznacznych danych dotyczących lokalizacji białka SUV39H1.

Rozprawę kończą rozdziały pt. „Podsumowanie i wnioski” obejmujący 7 pozycji, stanowiących skondensowany zapis uzyskanych rezultatów badań oraz „Wnioski” obejmujący osiem prawidłowych sformułowań, nie będące powtórzeniem wyników a efektem dojrzałych przemyśleń i właściwie poprowadzonej dyskusji. Trafnie ujęte wnioski z wielokierunkowych badań świadczą o dużej zdolności Autorki do syntetycznej analizy wyników uzyskanych w pracy.

Moja ogólna ocena wartości merytorycznej pracy jest bardzo wysoka. Uzasadniając tę ocenę podkreślić należy oryginalność badań, ich szeroki, wielowątkowy zakres i fakt, że praca wnosi nowe wartości poznawcze. Pani mgr inż. Agnieszka Gadecka wykazała się dobrą znajomością planowania i przeprowadzenia eksperymentu badawczego oraz umiejętnością analizy uzyskanych wyników a założone cele badań zostały w pełni zrealizowane. Na

podkreślenie zasługuje zakres uzyskanych wyników na różnym poziomie organizacji genomu pozwalający na szerokie przedstawienie obrazu zmian zachodzących w chromatynie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych podczas procesu starzenia, uwzględniając różne jego typy oraz modyfikacje histonu H3.

Moja ocena strony technicznej i redakcyjnej rozprawy jest również wysoka. Zawarte w recenzji uwagi, które w większości dotyczą aspektów techniczno-redakcyjnych nie umniejszają wysokiej wartości rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Gadeckiej.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę podkreślone w recenzji walory pracy, a szczególnie jej nowatorski charakter, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Gadeckiej pt.: „Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Gadeckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wniosek dodatkowy

Biorąc pod uwagę ponadprzeciętny poziom badań opisanych w rozprawie, aktualność problematyki badawczej, zastosowane współczesne, najnowocześniejsze metody badawcze i kompleksowość opracowania oraz ponadprzeciętny charakter rozprawy, składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Gadeckiej stosowną nagrodą.

Marek Zygus-Pawłowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Gadeckiej
pt. Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w
zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3**

Przedstawiona do recenzji rozprawa powstała pod kierunkiem dr hab. Anny Bielak-Żmijewskiej w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN – renomowanym zespole badawczym zajmującym się mechanizmami starzenia komórkowego. Celem badania była analiza zmian wybranych modyfikacji histonu H3 i zmian w strukturze chromatyny w komórkach poddanych różnym typom starzenia. Analizy przeprowadzono w różnych typach komórek, zarówno w ustabilizowanych liniach komórkowych mięśni gładkich naczyń (VSMC) i fibroblastów, jak i w komórkach mięśni gładkich blaszek miażdżycowych pozyskanych od pacjentów, u których wykonano zabieg operacyjny połączony z resekcją takich zmian. Starzenie przyspieszone (PS) w VSMC stanowiących główny materiał badawczy Doktorantka wywoływała poprzez traktowanie doksorubicyną lub kurkuminą, zaś starzenie replikacyjne (RS) poprzez prowadzenie hodowli do momentu wyczerpania potencjału podziałowego. Podobnie traktowała fibroblasty, które stanowiły kontrolę mającą wykazać, czy zmiany zaobserwowane w VSMC pojawiają się również w innym typie komórek, co przemawiałoby za ich uniwersalnością. Z kolei porównanie zmian w VSMC i w komórkach pochodzących z blaszek miażdżycowych umożliwiło określenie czy zachodzące w toku starzenia zmiany w najpowszechniej wykorzystywanym modelu, *in vitro*, dobrze odzwierciedlają zmiany zachodzące w żywym organizmie.

W pierwszym etapie pracy Doktorantka charakteryzowała zmiany zachodzące w VSMC przy użyciu metod standardowych: mikroskopowej oceny morfologii komórek, aktywności SA- β Gal i wbudowywania BrdU. Następnie, analiza zmian morfologicznych dotyczących kształtu i wielkości jądra komórkowego oraz struktury chromatyny prowadzona przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM) wykazała, że jądra komórek młodych mają owalny kształt i regularne brzegi, posiadają wyraźnie zarysowane jąderka oraz są małych rozmiarów. Z kolei jądra komórek RS są heterogenne, a większość z nich jest dużych i ma nieregularne kształty. Jądra komórek PS wykazują morfologię pośrednią. Charakterystykę zmian chromatyny wykonano przy pomocy programu Cell Profiler wykazując między innymi, że PS i RS charakteryzowały się bardziej jednolitym zabarwieniem jąder komórkowych niż młoda kontrola, co sugeruje, że w jądrach komórek

starych dominuje euchromatyna. Doktorantka wyznaczyła $200 \mu\text{m}^2$ jako wielkość graniczną powierzchni jądra komórkowego pomiędzy komórkami młodymi (poniżej wartości granicznej) i starymi (powyżej). Kolejne badania dotyczyły histonu H3 i modyfikacji charakterystycznych dla heterochromatyny (H3K9me3 i H3K27me3) oraz euchromatyny (H3K4me3 i H3K9Ac). W starzeniu zaobserwowano spadek całkowitego H3 o połowę w stosunku do komórek młodych. Wśród badanych modyfikacji epigenetycznych, największy spadek dotyczył H3K9me3, której ilość obniżyła się o ok. połowę w PS, aż do niemal całkowitego zaniku w RS. H3K27me3 dotyczył mniejszy spadek, który był podobny w obu typach starzenia. Spadkowi markerów heterochromatyny nie towarzyszył jednak wzrost markerów euchromatyny, jako że zaobserwowano również spadek H3K4me3 i H3K9Ac, przy czym spadek H3K4me3 wykazywał podobny profil do H3K9me3 i widoczne były różnice między PS i RS. Z kolei spadek H3K9Ac był niezależny od typu starzenia. W badaniach immunohistochemicznych zauważono również różnice pomiędzy komórkami młodymi i starymi w rozmieszczeniu tych znaczników w jądrach komórkowych. W kolejnych etapach pracy Doktorantka przeprowadziła szczegółowe badania, na poziomie mRNA i białka, dotyczące ilości licznych enzymów nakładających i usuwających konkretne modyfikacje epigenetyczne na poszczególnych resztach aminokwasowych histonu H3. Dodatkowo, analizowała wzbogacenie danym markerem aktywnej lub nieaktywnej chromatyny w rejonie TSS genu *EZH1*. Zajął się również analizą zmian ekspresji HP1 α , jego współwystępowania z innymi białkami jądrowymi oraz udziału w regulowaniu struktury chromatyny. Zanalizowała też miejsca w genomie wzbogacone w to białko. Wreszcie, metodą ChIP-seq przeanalizowała rozmieszczenie badanych modyfikacji epigenetycznych histonów w genomie młodych i starych VSMC, a na podstawie uzyskanych wyników wykonana została analiza bioinformatyczna w celu wskazania, jakie procesy biologiczne mogą ulegać zmianom w starzeniu pod wpływem obecności konkretnych modyfikacji w genach kodujących białka włączone w te procesy. Jak wspomniałam powyżej, aby sprawdzić, czy związane ze starzeniem zmiany wykazane w VSMC mają charakter uniwersalny czy są specyficzne dla tego typu komórek, część analiz powtórzono na ludzkich fibroblastach skórnych. Biorąc tutaj pod uwagę różnice w tempie proliferacji, Doktorantka wyznaczyła 48-godzinny okres hodowli fibroblastów tak, by komórki VSMC i fibroblasty znajdowały się w podobnym odsetku w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wykazała, że w fibroblastach również dochodzi do związanego ze starzeniem ogólnego spadku histonu H3. Ponadto, profil ekspresji H3K9me3, H3K4me3 oraz H3K9Ac przypominał ten obserwowany w komórkach VSMC i istnieje duże prawdopodobieństwo, że są to uniwersalne znaczniki starzenia komórkowego. Natomiast

w odniesieniu do H3K27me3 w starzejących się replikacyjnie fibroblastach, w przeciwieństwie do VSMC, nie obserwowano znaczących zmian w porównaniu do komórek młodych. Podobieństwa stwierdzono w analizach z barwieniami immunohistochemicznymi. Nie uzyskano pełnej zgodności pomiędzy VSMC i fibroblastami w analizach dotyczących enzymów modyfikujących. Niewielką część analiz wykonano również na komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych od pacjentów. Badanie to wykazało, że w porównaniu do hodowli komórkowych, wyniki uzyskane na komórkach pierwotnych są bardzo heterogenne. Pokazuje to, z jak wielkim problemem mierzą się osoby badające oryginalny materiał biologiczny od pacjentów w porównaniu z badaniami na różnych modelach, w tym – hodowlach komórkowych. Wreszcie, Doktorantka przebadła i zaproponowała dwa nowe markery starzenia komórkowego – Anilinę (ANLN) i Klaudynę-1 (CLDN1).

Rozprawa doktorska ma układ typowy. We **Wstępie** Doktorantka opisuje rodzaje starzenia komórkowego i szlaki w te procesy włączone. Szczegółowo opisuje zmiany zachodzące w starzejącej się komórce, zwłaszcza te, które dotyczą jądra komórkowego i epigenomu. Analizuje też wpływ starzenia komórkowego na starzenie całego organizmu wspominając przy tym, że senescencja nie zawsze jest niekorzystna, bo stanowi jeden z mechanizmów obronnych w procesie nowotworzenia. Jest to ciekawa część pracy, ale mam do niej dużo drobnych uwag. Szkoda, że duża liczba cytowań dotyczy prac przeglądowych. Nie mam przekonania, że sformułowanie „komórki somatyczne nie mają zdolności do odbudowy brakujących sekwencji, ponieważ poziom odpowiedzialnego za ten proces enzymu telomerazy, spada wraz z wiekiem” jest całkiem zgodne z prawdą, bo dane literaturowe wskazują, że w większości komórek somatycznych telomeraza nie jest aktywna. Nie jest też do końca zgodne z prawdą, że przyczyną przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, który może towarzyszyć starzeniu, jest jedynie nagromadzenie komórek senescentnych i SASP. Dużą rolę odgrywają inne czynniki, np. zwiększona zawartość tkanki tłuszczowej i nacieki komórek odpornościowych oraz szeroko pojęte immunostarzenie. Ponadto, żadne senolityki nie są rekomendowane jako leki antystarzeniowe, więc jeszcze nie można powiedzieć, że komórki stare stały się celem terapeutycznym w przypadku starzenia organizmu oraz w chorobach wieku podeszłego. Doktorantka również pisze, że „do starzenia organizmu dochodzi nie tylko na skutek upływu lat, ale może wystąpić przedwcześnie na drodze przyspieszonego starzenia komórek, wynikającego z zaburzenia funkcjonowania jądra lub nieprawidłowej replikacji i naprawy DNA”. To prawda, ale przyspieszone starzenie może również być skutkiem oddziaływań środowiskowych, a o wpływie środowiska na tempo i przebieg starzenia

Doktorantka w swojej rozprawie w ogóle nie wspomina, mimo że do 9 dekady życia najprawdopodobniej to właśnie ono ma wpływ decydujący (Herskind *et al.*, Hum Genet. 1996;97:319-323; Hjelmberg *et al.*, Hum Genet. 2006;119:312-321). W opisie miRNA jest kategoryczne stwierdzenie, że miRNA przyłączają się do 3'UTR, ale mogą się też przyłączać do innych części mRNA. Naczynia krwionośne nie są zbudowane jedynie ze śródbłonna.

W **Materiałach i Metodach**, które są dobrze opisane i świetnie zilustrowane rycinami, brakuje jasno określonych liczebności linii komórkowych stanowiących materiał badawczy: ile linii VSMC, ile linii fibroblastów? Jakie to były linie, od osób w jakim wieku – dotyczy to zwłaszcza fibroblastów, bo takich linii jest bardzo dużo. Przy opisie doświadczeń z liniami komórkowymi nie ma podanej liczby powtórzeń. W przypadku komórek mięśni gładkich z blaszek miażdżycowych nie podano wieku pacjentów ani stopnia zaawansowania choroby, a są to parametry które mogły mieć kluczowy wpływ na zaobserwowaną przed Doktorantką heterogenność, która nie pozwoliła na wyciągnięcie wniosków. Proszę też o komentarz, czy VSMC w 10 pasażu i fibroblasty w 25 pasażu (lepiej jest podawać liczbę podwojeń populacji) można nazwać komórkami młodymi. Czy tak długa hodowla nie ma wpływu na epigenom komórek? Przy opisie wirowań lepiej używać wartości x g a nie rpm, bo taka sama wartość rpm w różnych wirówkach i rotorach oznacza inną wartość g. Żałuję również, że w badaniach oprócz Laminy B1 Doktorantka nie analizowała Progeryny, która występuje nie tylko w progerii Hutchinsona-Gilforda, ale również pojawia się w komórkach osób normalnie się starzejących (Scaffidi *et al.*, Science. 2006;312:1059-1063). Do zalet tej części pracy należy wymienienie współwykonawców tam, gdzie Doktorantka nie wykonywała badania samodzielnie. Świadczy to o wysokim morale i uczciwości naukowej. Ponadto, chciałabym podkreślić, że na wielkie uznanie zasługuje różnorodność metod, jakimi Doktorantka się posługuje, liczba parametrów, które analizuje oraz to, że nie ograniczyła się jedynie do badania VSMC.

Hipoteza i Cele badawcze są jasno sformułowane i Doktorantka konsekwentnie te cele realizuje.

Wyniki to mocna część rozprawy. Wyniki są opisane bardzo szczegółowo, doskonale zilustrowane. W odbiorze przeszkadzała mi jedynie sprawa liczebności: czy $n = 5$ albo $n = 3$ oznacza liczbę linii/hodowli czy liczbę powtórzeń z tej samej linii? Czym jest $n = 3$ przy densytometrii: czy to 3 osobne bloty czy 3 pomiary z tego samego materiału na 3 liniach? „Średnia liczba skupisk na jądro komórkowe ($n = 3$) – ponownie, czym jest $n = 3$? Analizę qPCR wykonano na materiale z blaszek miażdżycowych od 3 z 6 pacjentów; jak ich wybrano?

Dyskusja jest ciekawa. Szczególnie wartościowa wydaje mi się część dotycząca Aniliny i Klaudyny-1. W tej części rozprawy brakuje mi natomiast głębszej analizy przyczyn różnorodności zmian zaobserwowanych w blaszkach miażdżycowych. Informacja, że są „zależne od dawcy” jest niewystarczająca. Należy pamiętać, że finalnym celem prac badawczych jest poznanie procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących w żywym organizmie.

Podsumowanie i wnioski są poprawne. **Bibliografia** jest bardzo obfita.

W pracy jest sporo błędów edytorskich, które nie wpływają na jej wartość merytoryczną. Chciałabym również zwrócić uwagę, że w literaturze polskojęzycznej powszechniejsza jest forma „ekson” niż „egzon”.

Wszystkie powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej rozprawy. Stwierdzam, że mgr inż. Agnieszka Gadecka wykazała się szeroką wiedzą oraz znajomością licznych i różnorodnych metod badawczych, które samodzielnie lub we współpracy stosowała realizując założone cele. Jej rozprawa doktorska zawiera oryginalne, wartościowe wyniki, a Doktorantka wykazała się również umiejętnością ich krytycznej oceny. W mojej opinii **rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Gadeckiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630)**. W związku z powyższym, **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Gadeckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Z poważaniem,



Monika Puzianowska-Kuźnicka

Warszawa, 07.12.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec
Katedra i Zakład Histologii
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny w Gdańsku

Gdańsk, 05.12.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Gadeckiej pt.:

Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3.

Praca doktorska została wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego pod kierunkiem Promotora – dr hab. Anny Bielak-Żmijewskiej, profesora Instytutu Nenckiego.

Tematykę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam za aktualną i ważną z punktu widzenia biomedycyny. Jak powszechnie wiadomo, w krajach wysoko rozwiniętych stale rośnie liczba osób w podeszłym wieku, co obok wielu pozytywnych efektów, niesie z sobą szereg wyzwań dla systemów opieki socjalnej i medycznej oraz ochrony zdrowia. Nietrudno jest dostrzec, że u znacznej części osób starych i bardzo starych znacznie częściej występują przewlekłe choroby, a także choroby nowotworowe. Poznawanie biologicznego podłoża oraz patomechanizmów tych schorzeń ma podstawowe znaczenie dla zapobiegania ich rozwojowi oraz skutecznej terapii. Wydaje się, że obecnie, w trzeciej dekadzie 21 wieku, badacze procesów starzenia przechodzą od stadium eksploracji ich mechanizmów na poziomie komórkowym i systemowym do prób terapeutycznej interwencji w jego podstawy molekularne, co obrazują coraz liczniejsze oceny efektów i mechanizmów działania tzw. senolityków. W tym kontekście należy uznać wybór tematu badań zaprezentowanych w omawianej rozprawie doktorskiej mgr inż. Agnieszki Gadeckiej za bardzo aktualny i potrzebny. Badania te stanowią kontynuację, w oparciu o nowoczesne techniki badawcze, dotychczasowych wybitnych osiągnięć zespołu Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. Nenckiego kierowanego przez Panią Profesor dr hab. Ewę Sikorę.

Rozprawę przygotowano w klasycznej formie, w której po Wstępie następuje opis materiałów i zastosowanych metod, a następnie przedstawienie wyników i ich omówienie w dyskusji i przedstawienie wniosków. Praca liczy 211 stron, zawiera 10 tabel i 78 rycin (w tym 43 ryciny w rozdziale „Wyniki”) obrazujących założenia, metody i wyniki badań, w tym szereg wysokiej jakości mikrofotografii uzyskane przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej. Szeroki zakres wykonanych analiz oraz liczne odniesienia literaturowe, łącznie 301 pozycji, składają się na znaczną objętość rozprawy doktorskiej.

Rozdział wstępny, liczący 34 strony, uważam za ważną część rozprawy, ponieważ zawarte w nim informacje dokumentują zarówno bardzo dobrą orientację Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy oraz w logiczny sposób prowadzą do przedstawienia założeń i celu podjętych badań. W 14 podrozdziałach Wstępu Doktorantka przedstawiła najpierw ogólne zmiany zachodzące w starej komórce, a następnie główne rodzaje starzenia komórkowego i jego rolę w starzeniu się całego organizmu. W kolejnym podrozdziale Wstępu Doktorantka omawia architekturę jądra komórkowego. Największą część tej części rozprawy stanowi dość dokładne przedstawienie modyfikacji epigenetycznych DNA i histonów wraz z zaznaczeniem roli niekodujących RNA w regulacji ekspresji genów. Oddzielnie przedstawiono charakterystykę i rolę białka heterochromatyny 1, HP-1 α , które było osobnym przedmiotem przeprowadzonych badań. Logiczną konsekwencją przedstawionych wcześniej informacji stanowi omówienie zmian w strukturze jądra i chromatyny, które towarzyszą starzeniu komórkowemu. Rozdział wstępny zamyka omówienie udziału starzenia komórkowego w rozwoju miażdżycy naczyń, choroby charakterystycznej dla większości osób w wieku podeszłym, która jest istotnym, bezpośrednim lub pośrednim, powodem śmierci około 30% populacji (na równi z chorobami nowotworowym).

W świetle danych dotyczących starzenia komórkowego i towarzyszących im zmian w jądrze komórkowym, a szczególnie zaskakującemu zjawisku rozluźnienia chromatyny („deheterochromatynizacji”), zrozumiałe stało się sformułowanie hipotezy badawczej i szczegółowych celów pracy. W związku z kluczową rolą komórek mięśni gładkich ścian naczyń (VSMC), głównie tętnic w patogenezie miażdżycy, postanowiono w modelu *in vitro* porównać zmiany w strukturze chromatyny, ze szczególnym uwzględnieniem zmian epigenetycznych histonu H3 oraz zmian powiązanego z nim białka HP-1 α w komórkach VSMC hodowanych w warunkach starzenia replikacyjnego (RS), t.j. w komórkach nieproliferujących, oraz w komórkach hodowanych w warunkach przyspieszonego starzenia (PS), t.j. w komórkach poddanych działaniu doksorubicyny i kurkuminy. Dodatkowe

cele szczegółowe stanowiło określenie zmian w komórkach poddanych RS i PS ze zmianami *ex vivo* komórek izolowanych z blaszki miażdżycowej oraz poznanie niektórych modyfikacji histonów w hodowanych fibroblastach w celu określenia uniwersalności zmian towarzyszącym badanym typom starzenia. W opinii recenzenta, Doktorantka powinna podkreślić w założeniach pracy to, że modele starzenia replikacyjnego oraz starzenia przyspieszonego zostały wcześniej opracowane i opublikowane przez Promotora rozprawy i innych autorów. Informacja ta została wprawdzie przedstawiona w rozdziałach Metody i Wyniki, ale niejako „przy okazji”, a nie jako punkt wyjścia do zamierzonych badań.

Rozdział Materiał i Metody został napisany jasno i starannie. Należy podkreślić bardzo szeroki zakres metod i technik zastosowanych przez mgr inż. Agnieszkę Gadecką dla scharakteryzowania obiektów badań, a także umiejętność współpracy z badaczami z innych niż macierzysty, ośrodków naukowych. Szczególne uznanie budzi scharakteryzowanie badanych komórek na wielu poziomach ich organizacji, poczynając od morfologii, a kończąc na analizie profilu transkryptomycznego z weryfikacją ekspresji wybranych genów metodą qPCR oraz immunoprecypitacji histonów i sekwencjonowaniu nowej generacji (CHIP seq). Drobne zastrzeżenie budzi określanie odsetka komórek wykazujących reakcję barwną charakterystyczną dla SA-beta-galaktozydazy (SA- β -gal) jako „procent komórek z podwyższoną aktywności [enzymu], ponieważ aktywność enzymu nie była mierzona tą metodą. Ponadto, w terminologii histologicznej mówimy raczej o utrwalaniu tkanek/komórek w utrwalczu Carnoy lub płynie Carnoy, a nie w „roztworze” Carnoy.

Rozdział „Wyniki” przedstawia kilka zasadniczych grup uzyskanych rezultatów. W pierwszej części tego rozdziału mgr inż. A. Gadecka zweryfikowała opracowane wcześniej w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia warunki prowadzenia hodowli VSMC pozwalające na wyróżnienie starzenia replikacyjnego oraz starzenia przyspieszonego. W opinii recenzenta, w tym drugim przypadku należałoby mówić raczej o starzeniu indukowanym przez stres (doksorubicynę lub kurkuminę), jednak użyte określenie (PS) można zaakceptować, gdyż podkreśla tempo powstawanie zmian komórkowych przypominających cechy starzenia replikacyjnego. Pierwszą część wyników doświadczeń przedstawionych w rozprawie można określić umownie jako morfologiczne. W stosunku do metod używanych wcześniej przez Profesor Annę Bielak-Żmijewską i Jej współpracowników, Doktorantka przeprowadziła po raz pierwszy przy pomocy mikroskopii sił atomowych oraz mikroskopii konfokalnej analizę morfologii i chropowatości jądra oraz białek blaszki jądrowej w komórkach kontrolnych oraz komórkach starych (RS i PS) wykazując wzrost chropowatości oraz przemieszczanie się

podotoczkowych fragmentów chromatyny w głąb jądra. Mikroskopia fluorescencyjna (barwienie DAPI) posłużyła do analizy zmian w organizacji chromatyny w warunkach starzenia RS i PS, a uzyskane metodą półilościową wyniki potwierdziły wcześniej opisywane jakościowe zmiany powierzchni jądra i kształtów komórek. Zarówno przy omawianiu tych oraz innych zmian Doktorantka podejmowała próby skrótego wyjaśniania ich przyczyn, jednak zazwyczaj brak oparcia w piśmiennictwie sprawia raczej wrażenie spekulacji niż racjonalnie wyprowadzonego dowodu.

Drużga część wyników dotyczy względnej zawartości zmodyfikowanych (metylowanych i acetylowanych) wariantów histonu H3. Wyniki uzyskane metodą Western blot potwierdziły w obu typach starzenia (RS i PS) spadek zawartości histonu H3K9me3, znacznika heterochromatyny, oraz, nieoczekiwanie, spadek zawartości wariantów histonu H3 charakterystycznych dla euchromatyny (H3K4me3 i H3K9Ac). Należy z uznaniem podkreślić, że „deheterochromatyzacja” i „rozluźnienie chromatyny” zostały przez Doktorantkę potwierdzone barwieniami immunofluorescencyjnymi badanych wariantów histonu H3 i analizą intensywności fluorescencji. Uzyskane wyniki skłoniły badaczy do oceny ekspresji metylotransferaz i demetylaz histonu H3 uczestniczących w regulacji struktury chromatyny na poziomie genu (analiza mikromacierzy i qPCR) i białka (IHC oraz WB). Wykazano kilkukrotny spadek ekspresji metylotransferazy SUV39H1 uczestniczącej wraz z białkiem HP-1 α w stabilizacji heterochromatyny oraz mRNA genu *EZH2*, który pełni kluczową rolę w procesach metylacji. Za istotną obserwację należy także uznać wzrost ekspresji genu *EZH1* we wszystkich typach starzenia komórek VSMC oraz brak zmian w ekspresji genów demetylaz histonów. Z kolei analiza ekspresji genów acetylotransferaz wykazała spadek poziomu mRNA większości tych genów, natomiast jedynie transkrypt i białko kodowane przez gen deacetylazy HDAC1 ulegały około dwukrotnemu obniżeniu w trakcie starzenia. W związku z rolą białka HP-1 α w tworzeniu nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny wykazano spadek jego ekspresji na poziomie transkryptu i białka (WB oraz immunofluorescencja) w komórkach podlegających starzeniu, przy czym wzrosła liczba jego skupisk w jądrze przy wyraźnie zmniejszonej intensywności fluorescencji.

Trzecia część rozdziału „Wyniki” poświęcona jest analizie rozmieszczenia w genomie wariantów histonu H3 charakterystycznych dla hetero- lub euchromatyny przy zastosowaniu immunoprecypitacji chromatyny sprzężonej z sekwencjonowaniem nowej generacji (CHIP-seq). Istotny spadek całkowitej liczby regionów wzbogacenia w histon H3K4me3 zaobserwowano wyłącznie w komórkach poddanych działaniu doksorubicyny, przy braku

zmian w komórkach młodych (kontrolnych), RS i traktowanych kurkuminą. Wyniki uzyskane wspomnianą metodą dobrze ilustrują różnice w mechanizmach „przyspieszonego starzenia” indukowanych doksorubicyną i kurkuminą. Z tego względu dla dwóch wersji PS Doktorantka podjęła próbę analizy funkcjonalnej miejsc w genomie wzbogaconych w znaczniki aktywnej (H3K4me3) i nieaktywnej (H3K9me3) chromatyny oraz miejsc wzbogacenia w HP-1 α przy pomocy programu edgeR. Wydaje się, że Doktorantce nie udało się uzyskać jednoznacznych wyników.

Z kolei na podstawie przeprowadzonej w oparciu o technikę mikromacierzy analizy funkcjonalnej genów charakterystycznych dla starzenia replikacyjnego i przyspieszonego wykazano istotne różnice w transkryptomie obu typów starzenia *in vitro* komórek VSMC. Ciekawą obserwacją wydaje się bardzo duży spadek ekspresji histonów, wspólny dla RS i PS. Natomiast wykazano znaczny wzrost liczby genów ulegających ekspresji niż zahamowaniu w PS w porównaniu do komórek RS, przy czym odwrotna sytuacja wystąpiła między oboma typami starzenia w ekspresji małych jądrowych RNA (snoRNA).

Kolejna część doświadczeń przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr inż. A. Gadeckiej poświęcona jest porównaniu właściwości młodych komórek VSMC z cechami komórek VSMC wyizolowanych z blaszek miażdżycowych od osób o średnim wieku 59 lat i hodowanych *ex vivo*, określanych jako naturalnie stare komórki zmodyfikowane przez proces miażdżycowy („komórki blaszki”, „blaszki”, komórki AP”). W przekonaniu recenzenta jest to bardzo wartościowa część badań mimo niewielkiej ilości materiału i liczby osób, od których go uzyskano. Okazało się, że izolowane z blaszek komórki stanowią heterogenną populację, w której 60% komórek wykazywało aktywność SA- β -gal (znacznika starzenia komórkowego), ale aż 60% wykazywało aktywność proliferacyjną, niezgodnie z fenotypem RS, ale zgodnego z fenotypem komórek młodych. Na wysoką zmienność osobniczą wskazywały też przeprowadzone w hodowlach tych komórek analizy ich morfologii, a szczególnie jąder komórkowych oraz analizy modyfikacji histonów. Wydaje się, że wyniki uzyskane w tej części badań wskazują na zróżnicowany charakter zmian związanych z rozwojem miażdżycy w komórkach mięśni gładkich w blaszkach miażdżycowych.

Przedostatnia część rozdziału „Wyniki” poświęcona jest porównaniu właściwości hodowanych komórek VSMC z hodowlami fibroblastów, komórek stanowiących klasyczny model badania starzenia replikacyjnego. Zamierzano sprawdzić, czy opisane wcześniej zmiany obserwowane w komórkach VSMC w modelu starzenia replikacyjnego oraz przyspieszonego zostaną odzwierciedlone w fibroblastach poddanych działaniu tych samych czynników.

Okazało się, że większość zmian, ale nie wszystkie, które charakteryzują starzenie VSMC ma charakter uniwersalny, ponieważ zaobserwowane je także w procesie starzenia fibroblastów.

Ostatnia część rozdziału „Wyniki” przedstawia rezultaty analizy ekspresji białek aniliny i kładyny-1 w VSMC, wytypowanych na podstawie badań transkryptomu, jako nowe znaczniki, aniliny - starzenia replikacyjnego i starzenia przyspieszonego, zaś kładyny-1 – starzenia przyspieszonego. Zgodnie z oczekiwaniami, ekspresja aniliny, kluczowego białka pierścienia kurczliwego, ulegała istotnemu obniżeniu w obu typach starzenia komórkowego, natomiast ekspresja kładyny-1 na poziomie mRNA ulegała podwyższeniu, jednak na poziomie białka tylko w komórkach podlegających PS. Zauważono też, że przejście silnego sygnału fluorescencji białka z jądra do cytoplazmy cechuje tylko starzenie przyspieszone. Dla lepszej charakteryzacji powiązań między obydwoma białkami a metylowanymi wariantami histonu H3 wykorzystano metodę CHIP-seq. Poziom ekspresji genów i białek aniliny i kładyny-1 określono też w komórkach VSMC pozyskanych z blaszek miażdżycowych kilku chorych, jednak duża zmienność międzyosobnicza nie pozwoliła na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Rozdział „Dyskusja” świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w piśmiennictwie dotyczącym tematu swoich badań. Na jej wstępie mgr inż. A. Gadecka uzasadniła wybór doksorubicyny i kurkuminy ustalonych we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia IBD PAN jako czynników przyspieszających starzenie się VSMC, które istotnie różniły się mechanizmami działania na DNA. Cel badań, jakim było określenie zmian strukturalnych chromatyny w przyspieszonym starzeniu indukowanym wymienionymi związkami, stanowił więc twórcze rozwinięcie opracowanych w Pracowni modeli starzenia *in vitro* komórek mięśni gładkich ścian naczyń w oparciu nowo dostępne techniki badawcze, takie jak mikroskopia sił atomowych, analiza transkryptomiczna oraz sekwencjonowanie nowej generacji CHIP-seq. Mgr inż. A. Gadecka umiejętnie interpretuje wyniki swoich badań odnosząc się, tam gdzie jest to możliwe, do wyników przedstawianych przez innych badaczy. Często jednak własne wyniki są na tyle nowatorskie, że konieczne jest szukanie asocjacji z innymi modelami badań nad starzeniem komórkowym lub z innymi rodzajami hodowanych komórek. Pewien niedosyt budzi brak szerszego wytłumaczenia klasycznego objawu RS jakim jest wzrost wielkości jądra, ponieważ wzmianka o mało skomplikowanej strukturze DNA w badanych VSMC wydaje się mało przekonująca. Analiza transkryptomiczna potwierdziła nowatorski charakter badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, ponieważ w dostępnym piśmiennictwie brak jest publikacji porównujących

zmiany transkryptomu VSMC w komórkach podlegających starzeniu replikacyjnemu i dwóm rodzajom starzenia przyspieszonego. Mgr inż. A. Gadecka potrafi krytycznie ocenić ograniczenia stosowanych technik badawczych, czego przejawem jest dyskusja dotycząca braku oceny ekspresji histonów kanonicznych. Doktorantka potrafi także w sposób wyważony odnieść się do różnic między uzyskanymi przez Nią danymi a wynikami badań innych autorów nad spadkiem ekspresji znaczników heterochromatyny oraz chromatyny aktywnej. Należy jednak podkreślić, że pod tym względem w piśmiennictwie zamieszczono nieliczne publikacje. Pewien niedosyt związany z niedostatecznym cytowaniem prac innych autorów pozostawia potraktowanie przez Doktorantkę prac dotyczących ekspresji HP-1 α w innych rodzajach komórek, co wynika zapewne z faktu, że dane dotyczące tego białka w starzejących się VSMC zostały po raz pierwszy przedstawione w rozprawie doktorskiej. Z kolei obszernie omówienie (1/3 objętości rozdziału) roli kładyny-1 oraz aniliny jako nowych znaczników starzenia *in vivo* oraz *ex vivo*, jest dowodem bardzo dobrej orientacji Doktorantki w zakresie omawianej tematyki.

Przedostatnią część rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Gadeckiej stanowi podsumowanie głównych wyników i wnioski, a ostatnią – obszerna bibliografia.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić kilka nieścisłości, których wyjaśnienie może być pomocne w dalszym rozwoju naukowym Doktorantki. Rozprawa doktorska została napisana po polsku, ale bez zachowania skrótów właściwych naszemu językowi, ponieważ w tekście szeroko stosowane są anglojęzyczne skróty kluczowych rzeczowników takich, jak VSMC. W zasadniczo dobrze napisanym „Wstępie” brakuje odniesień literaturowych do niektórych stwierdzeń. N.p. na str. 20 podano, że w trakcie starzenia „wydajność degradacji wadliwych organelli w komórce ulega znaczącemu zmniejszeniu” bez cytatu. Niepotrzebnym trendem, obserwowanym także w wielu innych współczesnych publikacjach, jest powoływanie się, przy omawianiu pewnych procesów i zjawisk, nie na oryginalne doniesienia, lecz na prace poglądowe. W rezultacie uważny czytelnik musi poświęcić znacznie więcej czasu i starań na dotarcie do opisu określonego modelu doświadczalnego i technik badawczych zastosowanych przez autorów. N.p., wśród 178 cytowań zawartych we „Wstępie” rozprawy, ponad połowa to prace przeglądowe. Należy podkreślić, że zakres chronologiczny cytowani sięga roku 2023, co świadczy o bardzo dobrej orientacji mgr inż. A. Gadeckiej w aktualnym piśmiennictwie dotyczącym analizowanych przez Nią zagadnień.

Innym typowym problemem młodych naukowców posługujących się językiem polskim jest częste stosowanie żargonu laboratoryjnego. W przypadku omawianej rozprawy doktorskiej

niewątpliwie nadużywany jest zwrot „poziom” stosowany w miejsce słowa „zakres” (n.p. modyfikacji histonów) lub w miejsce określenia „względna zawartość” (n.p. białka ocenianego metodą Western blot). Nie można się też zgodzić na stosowanie określenia „total” zamiast „całkowity”, a także stosowania słowa „spadek” (n.p. „spadek histonu H3”, „spadek laminy B1”) bez wyjaśnienia jakiego parametru (mRNA, białko itp.) ten spadek dotyczy.

W kilku miejscach rozprawy mgr inż. A. Gadecka wspomina o spadku lub wzroście pewnego parametru, jednak w następnym zdaniu dodaje „Zmiany te są jednak nieistotne statystycznie” (np. na stronie 147). Należałoby raczej wspomnieć o tendencji lub trendzie, przytaczając wartość *p*.

Jak wspomniałem, Doktorantka zamieściła aż 301 odnośników do prac innych autorów. W rzeczywistości ich liczba jest nieco mniejsza, ponieważ kilka prac zostało podwójnie cytowanych (n.p. poz. 6, 17, 73, 129, 139).

Wymienione drobne uchybienia o charakterze redakcyjnym lub edytorskim w niczym nie umniejszają mojej wysoce pozytywnej oceny merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej. W opinii recenzenta uzyskane wyniki są w pełni oryginalne w odniesieniu do wybranego modelu doświadczalnego i jako takie posiadają istotne znaczenie dla nauki, a w przyszłości prawdopodobnie także dla praktyki klinicznej. Realizacja założonego celu badań wymagała wielkiej konsekwencji, wytrwałości i oczywiście pracowitości, a wykonana praca dobitnie dowodzi tych cech charakteru młodego naukowca.

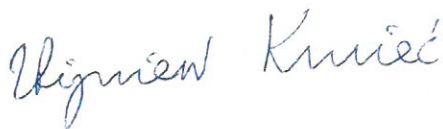
W podsumowaniu swojej opinii stwierdzam:

1. Oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Agnieszki Gadeckiej jako bardzo dobrą a nawet wybitną. Rozprawa prezentuje wysoki poziom wiedzy teoretycznej Doktorantki, co świetnie uwidaczniają „Wstęp” i „Dyskusja”.
2. Rozprawa doktorska wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę, co udowodniła opanowując szereg nowoczesnych metod badawczych umożliwiających uzyskanie oryginalnych wyników.
3. Rozprawa doktorska niewątpliwie stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, który został właściwie sformułowany i zrealizowany, a jego charakterystyka i ocena została przedstawiona powyżej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt. „**Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem modyfikacji histonu H3**” spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Gadeckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, oryginalność uzyskanych wyników oraz szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.



Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec