

Łódź, dnia 06.12. 2023 r.

dr hab. Renata Kontek, prof. UŁ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Agaty Głuchowskiej, pt.:

„Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz białka wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty – wpływ na funkcje limfocytów T” wykonanej w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Grażyny Mosieniak.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójną tematycznie monografię dotyczącą wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz białek wydzielanych przez stare komórki mięśni gładkich aorty na funkcje limfocytów T. Doktorantka za cel obrała sobie jeden z kluczowych procesów komórkowych, a mianowicie starzenie komórkowe, które należy do procesów złożonych i jest wypadkową zjawisk biochemicznych i fizjologicznych, przebiegających na różnych poziomach organizacji ustroju, od pojedynczej komórki, do tkanek i narządów włącznie. Proces starzenia, przebiegający na poziomie komórkowym, jest jednym z najlepszych modeli badań tego zjawiska, dzięki możliwości dogłębnego „wejścia” w zachodzące szlaki molekularne w komórce. Dodatkowym aspektem pracy są zagadnienia związane ze starzeniem komórek mięśni gładkich aorty, co ma związek z rozwojem miażdżycy u ludzi, której towarzyszy stan zapalny i podwyższony poziom wolnych rodników oraz tworzenie się, wraz z wiekiem, w naczyniach płytek miażdżycowych, co prowadzi do większego obciążenia układu naczyniowo-sercowego. Podejrzewa się, że jednym ze skutków fenotypu wydzielniczego SASP, generowanego przez komórki stare w obrębie blaszki miażdżycowej może być nasilenie prozapalnego charakteru środowiska w przestrzeni podśródbłonkowej. Jednym z ważniejszych elementów procesu starzenia organizmu jest starzenie się układu immunologicznego, co sprawia, że wraz z wiekiem pogarsza się odpowiedź immunologiczna organizmu zarówno humoralna, jak i komórkowa. Limfocyty T są rodzajem komórek, których czynności podczas postępującego procesu starzenia ulegają znacznemu upośledzeniu. Dlatego też badania dotyczące procesu starzenia komórkowego w aspekcie zmian miażdżycowych w powiązaniu z jego wpływem na odpowiedź immunologiczną organizmu, wydają się być niezwykle istotne i wciąż aktualne. W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Głuchowskiej, której

temat badawczy uważam za aktualny i trafny, a zastosowane modele badawcze są adekwatne do założonych celów.

Część teoretyczna recenzowanej pracy zawiera podstawowe elementy, takie jak: spis treści, stosowane skróty, streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie wprowadzenie teoretyczne oraz postawione cele badawcze.

W części praktycznej Doktorantka przedstawiła informacje na temat modeli badawczych oraz metodyki zastosowanej w badaniach. Po rozdziale opisującym uzyskane przez Doktorantkę wyniki, znajduje się Dyskusja, Posumowanie wyników i Wnioski oraz wykaz literatury. Do pracy dołączony został dorobek naukowy Doktorantki w postaci spisu publikacji oraz Suplement zawierający wyniki badań, które nie zostały włączone do głównego manuskryptu dysertacji. Szkoda, że Autorka nie pokusiła się o dołączenie informacji o Jej pozostałej aktywności naukowej, jak chociażby udziału w konferencjach czy też projektach naukowych (jeden został wymieniony na początku dysertacji – OPUS UMO 2014/15/B/NZ3/01150).

Znaczną część rozdziału **Wstęp** Doktorantka poświęciła omówieniu molekularnych uwarunkowań procesu starzenia na poziomie komórkowym, ze szczególnym uwzględnieniem markerów tego procesu. W pozostałej części **Wstępu** Autorka opisała jak starzenie komórkowe wpływa na rozwój określonych patologii związanych z wiekiem, koncentrując swoją uwagę na związku przyczynowo-skutkowym między miażdżycą a wiekiem organizmu. Zawarte we wstępie teoretycznym treści, w moim przekonaniu, dobrano poprawnie, pozwalając czytelnikowi lepiej zrozumieć problemy stawiane do rozwiązania w Celach pracy doktorskiej.

Założenia i Cele pracy doktorskiej oraz sposób ich realizacji zostały jasno sprecyzowane i scharakteryzowane, co znalazło odzwierciedlenie w rozdziale Wyniki.

Materiał i metody zastosowane w pracy doktorskiej zostały bardzo obszernie opisane w rozdziale 3. Doktorantka wykorzystała w przeprowadzonych przez siebie badaniach 3 typy komórek prawidłowych: 1. komórki mięśni gładkich aorty (dostępne komercyjnie z banku komórkowego oraz izolowane z blaszek miażdżycowych tętnicy szyjnej pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej, Państwowego Instytutu Medycznego MSWiA, na które to badania Autorka pracy uzyskała stosowną zgodę właściwej Komisji Bioetycznej), 2. preadipocyty oraz 3. fibroblasty skóry. Proces starzenia indukowano w komórkach za pomocą doksorubicyny lub nadtlenu wodoru, a następnie analizowano ich potencjał proliferacyjny, cykl komórkowy oraz poziom wybranych białek związanych ze starzeniem komórkowym. Następnie, Doktorantka przeprowadziła analizę proteomiczną sekretom komórek młodych i starych, w tym ulegających starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu. Na koniec oceniony został wpływ czynników wydzielanych przez starzejące się komórki mięśni gładkich na aktywację, proliferację i migrację limfocytów T oraz na wydzielanie cytokin.

Część doświadczalna pracy zawarta w rozdziale Materiały i metody została opisana w sposób umożliwiający odtworzenie poszczególnych eksperymentów, co jest dużą wartością dodaną tej rozprawy doktorskiej. Doktorantka do realizacji postawionych zadań badawczych zastosowała bardzo szeroki wachlarz technik z zakresu badań biologicznych, biochemicznych, biologii molekularnej i immunochemii. Niewątpliwie, wymagało to od Doktorantki dużego nakładu pracy

i zaangażowania, zarówno w opanowanie warsztatu badawczego, jak i samego czasu na przeprowadzenie wszystkich niezbędnych analiz.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawione zostały w postaci opisu oraz dobrze przygotowanych rycin i tabel, co sprawia, że są one przejrzyste i czytelne, pomimo ich ogromnej liczby. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że spadek poziomu białek jądrowych - laminy B1, HMGB1, PARP1 oraz białka zaangażowanego w regulację mitozy - cykliny B1 należą do uniwersalnych markerów starzenia komórkowego. Ponadto, odnotowała, że fenotyp komórek będących na późnym etapie starzenia komórkowego różni się od komórek znajdujących się na wczesnym etapie i jest zbliżony do fenotypu komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu. Na szczególną uwagę zasługuje wykonana przez Doktorantkę analiza wybranych markerów starzenia w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych jako modelu starzenia w warunkach *in vivo*. Autorka wykazała, że komórki ulegające starzeniu *in vivo* charakteryzowały się zwiększonym wydzielaniem czynników SASP, a profil wydzielniczy komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych w znacznym stopniu był zbliżony do profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu. Ponadto, zaobserwowała w ww. komórkach obniżenie poziomu białek, zaliczanych do uniwersalnych markerów starzenia. Komórki VSMC ulegające starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu wydzielają zdecydowanie więcej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a przeprowadzona przez Doktorantkę analiza proteomiczna pęcherzyków wykazała różnice w składzie sekretom komórek młodych i starych, jak i sekretom komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu. Końcowe, badania przeprowadzone przez Autorkę dotyczyły analiz bezpośrednio związanych z tematem rozprawy doktorskiej, w których wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą częściowo hamować aktywację komórek układu odpornościowego, a także promują sekrecję niektórych cytokin produkowanych przez te komórki. Zastosowane w pracy techniki badawcze pozwoliły otrzymać bardzo liczne wyniki badań, niemniej Doktorantka dobrze poradziła sobie z ich interpretacją.

Dyskusja stanowi przede wszystkim próbę kompleksowej oceny i omówienia otrzymanych wyników badań. W rozdziale tym Autorka wykazała się dużą systematycznością i kolejno każdą z obserwacji porównywała z danymi uzyskanymi przez inne zespoły badawcze oraz szukała danych pozwalających na wyjaśnienie rozbieżności, czy też tłumaczących potencjalny mechanizm zmian zaobserwowanych w przeprowadzonych eksperymentach. Dość obszerna literatura pochodzi w dużej mierze z ostatnich dziesięciu lat.

Dysertacja kończy się **Podsumowaniem** i **Wnioskami**, w których Doktorantka wskazała na kilka ważnych aspektów przeprowadzonych badań : 1. Białka: lamina B1, HMGB1, PARP1 oraz cyklina B1 są uniwersalnymi markerami rozróżniającymi komórki stare od komórek proliferujących i częściowo zatrzymanych w cyklu komórkowym, 2. Wykorzystanie analizy poziomu białka p16, jako wiarygodnego markera komórek starych, może nie być wystarczające w badaniach dotyczących procesu starzenia komórkowego. 3. Podwyższony poziom białek p21 i p16 w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych może świadczyć o różnicach w procesie starzenia zachodzącego w warunkach hodowli *in vitro* i w warunkach *in vivo*,

4. Fenotyp sekrecyjny komórek starych różni się ilościowo i jakościowo pod względem wydzielanych czynników w czasie i w zależności od rodzaju starzenia, 5. Czynniki wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty, w tym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wpływają na funkcjonowanie limfocytów T, promując rozwój stanu zapalnego bezpośrednio w blaszkach miażdżycowych.

Puentując ten etap recenzji, stwierdzam, że postawione cele pracy zostały w pełni osiągnięte, a wyniki przeprowadzonych badań mają duże znaczenie poznawcze. Przedstawione opracowanie stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora, dowodzi, że mgr inż. Agata Głuchowska opanowała bardzo dobrze warsztat metodyczny, poczynawszy od podstawowych technik laboratoryjnych poprzez techniki immunochemiczne, aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Na uznanie zasługuje obszerność, czasochłonność oraz widoczna w dysertacji etapowość zaplanowanych badań, a także imponująca dokumentacja fotograficzna zamieszczona w pracy. Należy również wspomnieć, że mgr inż. Agata Głuchowska swoje doświadczenie naukowe wzbogaciła jako wykonawca w projekcie OPUS kierowanym przez dr hab. Grażynę Mosieniak, a finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki.

Rozdział **Literatura** zawiera 223 pozycje, które są adekwatne do poruszanych w pracy doktorskiej treści i świadczą o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie ma ich dużo. Rozprawa napisana jest poprawnym językiem, starannie, a drobne błędy redakcyjne czy też stylistyczne są prawie niezauważalne i nie wpływają na wartość merytoryczną opracowania.

Niemniej, z obowiązku recenzenta chciałabym zadać Doktorantce pytania nawiązujące do przedstawionego opracowania:

1. Na stronie 42 rozprawy (rozdział 3 tj. Materiał i metody), Autorka wymienia materiał biologiczny, który wykorzystwała w swoich badaniach. Ludzkie preadipocyty oraz fibroblasty skóry zostały zakupione w banku komórek, odpowiednio: ScienCell i ATCC oraz GIBCO. Czy może Doktorantka podać więcej informacji na temat wykorzystanych linii komórkowych, w tym np. ich sygnatury, nazwę linii? Czym Doktorantka tłumaczy zastosowanie 3 składnikowego zestawu antybiotyków? Standardowo dodajemy dwa z nich to jest streptomycynę i penicylinę, natomiast w przeprowadzonych badaniach dodawano jeszcze amfoterycynę B, należąca do antybiotyków przeciwgrzybiczych, makrolidów o szerokim spektrum działania i dość wysokiej toksyczności, czego efektem jest zaburzenie integralności błony komórkowej. Amfoterycyna B powoduje także wzrost wydzielania m.in. cytokin.

2. Kolejna uwaga dotycząca rozdziału Materiał i metody odnosi się do pozyskiwania limfocytów: dlaczego dawcami materiału były tylko osoby płci męskiej? Czy były jakieś wskazania do ograniczania się do jednej płci? Jakie kryteria spełniały wymienione osoby, poza zakresem wieku, który został podany w pracy?

3. Kolejne moje pytanie jest związane z Ryciną 4.14. w rozdziale 4.1.6. i zamieszczonymi na niej danymi. Czym Doktorantka może wytłumaczyć pojawienie się dość dużej frakcji komórek w fazie S cyklu komórkowego w przypadku wariantu z użyciem komórek starych po działaniu nadtlenu wodoru, której wielkość była prawie zbieżna z tą uzyskaną dla komórek proliferujących?

4. Na Rycinie 4.17. przedstawiającej wyniki oceny potencjału proliferacyjnego komórek mięśni gładkich Doktorantka napisała, że: „w przypadku komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych niemal 60% komórek jest zdolnych do wbudowywania BrdU, przy czym jedynie ok. 20% komórek to komórki Ki67 pozytywne”. Czy mogłaby Doktorantka skomentować/rozbudować otrzymany wynik?

5. W rozdziale 4.1.6. (str. 94) Autorka pracy napisała, że: „...w komórkach, które po traktowaniu nadtlaniem wodoru hodowane były przez 4 tygodnie, zaobserwowano wzrost liczby komórek nieposiadających skupisk białka 53BP1 w porównaniu do komórek hodowanych 7 dni od indukcji starzenia. Może to świadczyć o aktywacji systemów naprawy uszkodzeń DNA w trakcie rozwoju fenotypu komórki starej”. Jakie systemy naprawy uszkodzeń DNA Autorka miała na myśli?

6. Rycina 4.25. przedstawia analizę poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem komórkowym w modelu *in vitro* z wykorzystaniem metody western blott. Pytanie moje związane jest z poziomem białka p21, którego poziom w komórkach kontrolnych czyli proliferujących jest dość wysoki w sytuacji kiedy w komórkach starych ten poziom jest zdecydowanie niższy. Czym można wytłumaczyć zaobserwowany efekt?

7. Ostatnia moja uwaga jest związana z używaną przez Doktorantkę terminologią, a także zapisem genów i białek. I tak, bardziej skłaniam się do używania terminu detekcja/immunodetekcja białka niż jego ekspresja/immunoekspresja, ponieważ ten ostatni termin używamy najczęściej w odniesieniu do genu. Uwagę moją zwrócił także zapis przez Autorkę pracy nazw genów i ich białkowych produktów. Zasada, która jest mi znana, polega na tym, że nazwy genów zapisujemy kursywą, a produkowane przez nie białka prostymi literami. Uważam, że taki zapis oddaje zróżnicowany charakter tych struktur. Warto o tym pamiętać przy dalszych opracowaniach związanych z rozpowszechnianiem wyników pracy.

Podsumowanie i Wniosek końcowy

Reasumując, uważam, że praca doktorska mgr inż. Agaty Głuchowskiej pt. **„Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz białka wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty – wpływ na funkcje limfocytów T”** stanowi spójne tematycznie dzieło, które wskazuje, że Doktorantka posiada wystarczającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jej badań, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań naukowych oraz interpretowania i komentowania ich wyników w świetle dostępnej literatury. Uważam, że podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej temat jest istotny i wartościowy, założone cele badawcze zostały wytyczone poprawnie, metody adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące. Stwierdzam, iż pomimo wysuniętych w recenzji uwag i komentarzy, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021 r. poz. 478 ze zm.). **Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Głuchowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**





UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Zakład Patofizjologii Starzenia i Chorób Cywilizacyjnych
Katedry Hipertensjologii

Adres:
ul. Długa 1/2
61-848 POZNAŃ

prof. dr hab. Justyna Mikuła-Pietrasik
tel.: 61 854 92 99
e-mail: jmikula@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Głuchowskiej, pt.: „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz białka wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty – wpływ na funkcje limfocytów T”

Proces starzenia się dotyczy nas wszystkich, a jego demograficzne ujęcie w postaci tzw. starzenia się społeczeństw jest jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. To starzenie się społeczeństw stanowi właśnie wyzwanie dla medycyny ze względu na zwiększoną częstość występowania chorób przewlekłych.

Układ immunologiczny, pełniący kluczowe funkcje regulacyjne w organizmie człowieka, jest relatywnie dobrze scharakteryzowany pod kątem zmian towarzyszących starzeniu. Najlepiej opisane kwestie to wzrost częstości występowania chorób autoagresyjnych wraz z wiekiem oraz częstsze występowanie infekcji i trudniejszy ich przebieg u osób starszych. Tło molekularno-komórkowe tych zjawisk jest także dość dobrze scharakteryzowane, a istotną w nich rolę przypisuje się zmianom czynnościowym zachodzącym wraz z wiekiem w obrębie różnego typu populacji limfocytów T. Zgromadzono wiedzę o znaczeniu replikacyjnego starzenia się tych komórek, zmienionej częstości apoptozy, a także upośledzonej reaktywności po zetknięciu się z antygenem. Natomiast to, o czym wiemy relatywnie niewiele, to między innymi szerokie znaczenie oddziaływania starych komórek mięśni gładkich aorty, w tym egzosomów, na funkcje limfocytów T w aspekcie miażdżycy naczyń. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, w tym ich szczególna frakcja – egzosomy, pełnią istotną rolę w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami. Mogą być nośnikami różnorodnego materiału komórkowego (m.in. białek, lipidów, DNA, mRNA, miRNA). Są uwalniane zarówno w warunkach fizjologicznych, jak również w stanach patologicznych, przez komórki młode jak i komórki stare bez względu na sposób ich starzenia. Uważa się, że mogą one pełnić rolę mediatorów w zjawiskach komórkowego starzenia i progresji komórek nowotworowych.

Za cel swoich badań Doktorantka postawiła scharakteryzowanie i porównanie fenotypu przyspieszonego starzenia w różnych typach komórek prawidłowych (komórki mięśni gładkich aorty, preadipocyty oraz fibroblasty skórne) hodowanych *in vitro*, wyznaczenie uniwersalnych znaczników tego procesu oraz porównanie zmian zachodzących w komórkach mięśni gładkich aorty ulegających przyspieszonemu starzeniu (na wczesnym i późnym etapie tego procesu) oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu.

Jednym z głównych zagadnień podjętych przez Doktorantkę było opracowanie modelu starzenia komórek mięśni gładkich aorty wyizolowanych z blaszek miażdżycowych pozyskanych od pacjentów, a następnie porównanie ich profilu wydzielniczego z modelem *in vitro*.

Doktorantka wzięła sobie także za cel określenie podobieństwa i różnic w proteomie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz czynników rozpuszczalnych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu oraz zbadanie ich wpływu na proliferację i różnicowanie się limfocytów T.

Rozprawa doktorska mgr inż. Głuchowskiej przygotowana jest w klasyczny sposób, z pewną drobną modyfikacją. Na rozprawę składa się: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia, Lista publikacji autorki rozprawy oraz ta drobna modyfikacja a więc Suplement pracy zawierający część uzyskanych wyników. Oprócz tego, rozprawa zawiera szczegółowy spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

W 20-stronnicowym Wstępie Autorka opisała starzenie komórkowe oraz jaką rolę odgrywa ono wobec zmian zachodzących w organizmie człowieka.

Autorka przedstawiła rys historyczny badań nad starzeniem replikacyjnym. W dalszej części tego rozdziału przedstawiła czym jest przyspieszone starzenie indukowane stresem oraz scharakteryzowała znaczniki procesu starzenia komórkowego. W sposób klarowny dla czytelnika Doktorantka omówiła powstawanie oraz biologiczne znaczenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych a także ich potencjalną rolę w indukcji miażdżycy, rozumianej, zgodnie z jej definicją, jako przewlekły proces toczący się dużych i średnich naczyniach krwionośnych.

Po merytorycznym wprowadzeniu w tematykę rozprawy, Doktorantka definiuje sześć założeń swojej pracy. Są wśród nich scharakteryzowanie i porównanie fenotypu przyspieszonego starzenia w różnych typach komórek prawidłowych hodowanych *in vitro* oraz wyznaczenie uniwersalnych znaczników/markerów tego procesu. W tym celu wykorzystane do badań były komórki mięśni gładkich aorty, preadipocyty oraz fibroblasty (pomimo, że te typy komórek prawidłowych pojawiły się już w celach rozprawy nie znalazło się miejsce na informację o nich w Podsumowaniu i wnioskach pracy). Następne cele dotyczą już badań nad komórkami mięśni gładkich w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz oceny ich szeroko pojętego profilu wydzielniczego w odniesieniu do aktywacji, proliferacji i różnicowania limfocytów T.

Kolejny rozdział, Materiał i metody liczy 28 stron. Autorka podzieliła go na dwa podrozdziały. W części opisującej Materiały został opisany materiał badawczy, przeciwciała i roztwory wykorzystywane podczas części eksperymentalnej. Drugi podrozdział to Metody, opisany w nim został wykorzystywany w pracy warsztat doświadczalny. Bardzo szczegółowy opis metod, którymi posługiwano się w pracy, świadczy o dużym doświadczeniu Doktorantki w tym obszarze badań i utwierdza w przekonaniu, że późniejsza interpretacja wyników będzie spoczywała rękach eksperta. Dla oceniającego nie jest natomiast jasne, dlaczego w tym podrozdziale nie wyczuwa się równowagi, w szczegółowości opisywanych metod. Można zauważyć, dla przykładu, że metoda 3.2.8.6 została jedynie przedstawiona w sposób bardzo ogólnikowy. Fakt, że Doktorantka nie dokonywała tych oznaczeń w swojej jednostce macierzystej nie powinien być umniejszony o szczegółowość, którą pochwałam w pozostałych częściach pracy.

Najobszerniejszą częścią rozprawy są Wyniki. Autorka przedstawia je na 71. stronach, posługując się tekstem, tabelami i rycinami. Wyniki dotyczące preadipocytów i fibroblastów zostały umieszczone w suplemencie pracy. W części wynikowej rozprawy znajdujemy m.in. charakterystykę ludzkich komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu przyspieszonemu indukowanemu stresem. Grupy te są poddawane ocenie, jednakże niewłaściwym formalnie jest określanie ich przez Doktorantkę „głodzonymi” – rozumiem, że są to hodowle utrzymywane w medium nie zawierającym surowicy - oraz „przegęszczonymi” jako hodowli występujących w pełnej zlewności komórek, wykazujących 100% konfluencji bądź wykazujących zahamowaną proliferację poprzez osiągnięcie kontaktowej strefy wzrostu. Przeszkadza mi kolokwializm w postaci tych określeń, którymi Autorka posługuje się w pracy.

Kolejnymi zagadnieniami przedstawionymi w formie wynikowej jest charakterystyka ludzkich komórek mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu *in vitro* i *in vivo*. Doktorantka dokonała, co z wielkim szacunkiem podkreślam, bardzo szerokiej analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich (komórki młode vs stare). Zastosowana metoda, opierająca się o interpretację map ciepła oraz analizę wizualizacji sieci oddziaływań jakie tworzą białka pochodzące z egzosomów ze szczególnym uwzględnieniem tych, które są zaangażowane w regulację funkcji komórek odpornościowych, utwierdza w poczuciu o dużej wiedzy i dobrym przygotowaniu Doktorantki. Całość prezentacji graficznej części wynikowej jest bardzo czytelna oraz profesjonalna; świadczy o wiedzy i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, jak i przedstawiana wyników swojej pracy. Ostatnia grupa wyników to badanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na aktywację i proliferację limfocytów T.

Liczącą 14 stron Dyskusja - zgodnie z zasadami sztuki - w skondensowany sposób odnosi się do uzyskanych wyników przez pryzmat badań innych zespołów, z uwzględnieniem własnej ich interpretacji. Jest to rozdział trafnie konfrontujący uzyskane wyniki z danymi światowymi z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa. W miejscach, w których wyniki uzyskane przez Doktorantkę stoją w sprzeczności z wynikami innych zespołów, dostrzegam umiejętność poszukiwania i identyfikowania przyczyn tych różnic.

Po Dyskusji znajduje się 2-stronnicowe Podsumowanie i wnioski. Podsumowanie zawiera skróconą formę uzyskanych wyników bez podawania ich wartości liczbowych, jedynie podkreślony jest kierunek uzyskanych zmian. W drugiej części tego podrozdziału Autorka rozprawy formułuje 5 bardzo zwięzłych wniosków, które we właściwy sposób podsumowują przeprowadzone badania. Doktorantka ustrzegła się w tej części pracy bardzo powszechnego błędu, jakim jest ponowne opisanie wyników zamiast wskazywania rzeczywistych wniosków.

Do przygotowania swej rozprawy doktorskiej Autorka wykorzystwała bardzo bogatą bibliografię. Większość cytowanych prac pochodzi z ostatnich lat, choć w pewnych momentach Doktorantka pozwoliła sobie także powołać się na starsze publikacje. Dobór literatury oceniam jako właściwy.

W tym miejscu, po podsumowaniu budowy i treści rozprawy, pozwolę sobie zwrócić uwagę na jeszcze kilka elementów tej pracy, które budzą moje wątpliwości lub wymagają przedyskutowania. Przy czym podkreślam, nie są to kwestie wpływające na odbiór i wagę

przedstawionych badań. Są to raczej elementy do rozważenia przez Doktorantkę na kolejnych etapach swojego rozwoju naukowego.

Dla łatwości odniesienia się do danego zagadnienia, przedstawię te uwagi w porządku chronologicznym.

1. Wykaz wybranych skrótów – fakt umieszczenia skrótu oraz podania wytłumaczenia jego w tej części jest wystarczający, by w dalszych częściach pracy posługiwać się już tylko skrótem, a nie na nowo w nawiasie każdorazowo umieszczać jego tłumaczenie – przykłady SASP wraz z tłumaczeniem na str. 33,105 czy np. PCNA str. 100 lub powtarzające się RS str. 105, 107, 111, 114.
2. Wstęp 1.3. – „Komórki, w których doszło do uszkodzenia materiału genetycznego, przestają się dzielić i ulegają starzeniu, wydzielając przy tym szereg cytokin, które następnie są rozpoznawane przez komórki żerne układu odpornościowego przyczyniając się do eliminacji komórek starych”. Jest to moim zdaniem daleko idące uproszczenie tego procesu a biorąc pod uwagę, że to dotyczy wstępu, należałoby dokładniej opisać procesy/możliwe drogi tego, co się dzieje z komórkami, w których doszło do uszkodzenia materiału genetycznego. A mianowicie - co dzieje się oprócz starzenia się komórki. Może warto by wspomnieć o roli (bądź możliwości wykorzystania) senolityków. Z tekstu wynika, że komórki żerne usuwając komórki stare z naszego organizmu pozbywają się „problemu”. Jest to chyba skrót myślowy ponieważ dobrze już zostały scharakteryzowane pewne komórki np. stare komórki mezotelium otrzewnowego w kontekście ich interakcji z komórkami mikrośrodowiska, w którym się znajdują.
3. Materiały i metody
 - 3.1.1.2 – Autorka przedstawia przykładowe zdjęcia z poszczególnych etapów izolacji – bardzo pochwalam zamieszczenie tych zdjęć, ale brakuje mi zapewnienia na podstawie charakterystycznego markera, że faktycznie Doktorantka pracowała na komórkach mięśni gładkich. Wieloletnie doświadczenie Zespołu, w którym pracowała Autorka, prawdopodobnie pozwala na ich identyfikację na podstawie oceny ich fenotypu/morfologii. Uważam jednak, że dla celów tej rozprawy takie zdjęcie identyfikacyjne powinno było się tu znaleźć.
 - 3.1.1.4 – Dlaczego jednym z wykorzystanych modeli badawczych w pracy były fibroblasty skórne, a nie fibroblasty ludzkie z aorty (dostępne są komercyjne) albo np. te wyizolowane z materiału śródoperacyjnego, z blaszki miażdżycowej? Czym się sugerowano w doborze właśnie komercyjnych fibroblastów skórnych, a nie tych związanych bezpośrednio z tematem pracy?
 - 3.2.3. – (...) 18 godzin w inkubatorze (...) rozumiem, że Autorka ma na myśli cieplarkę bądź inkubator bez CO₂, którego obecność mogłaby wpłynąć na zmianę pH i zmienić odczyt β -galaktozydazy związanej ze starzeniem oznaczanej przy pH 6.
 - 4.2.1 – w dostępnych publikacjach napotkać można na fakt wykorzystania wzrostu aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem poprzez stopień nasilenia barwy niebieskiej w cytoplazmie komórek starych. Możemy założyć, że jest to poprawne tylko pod warunkiem, że zebrane komórki w danych punktach czasowych były utrwalane i jednocześnie wybarwiane. Takiego komentarza nie znalazłam w pracy. Metoda ta nie jest metodą immunologiczną

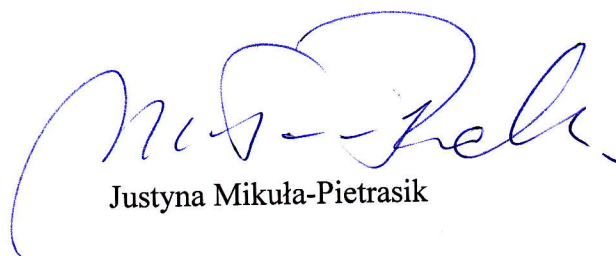
a jedynie dająca efekt barwny, stąd pomimo wykonania barwienia zgodnego z metodyką, ale wykonanego innego dnia i np. przez różne osoby, preparaty te mogą różnić się siłą wyrażenia barwy niebieskiej. Natomiast pochwalam jakość przepięknych barwień fluorescencyjnych (Ryc. 4.17)

- 6. – brak w Podsumowaniu i wnioskach informacji dotyczącej wyników uzyskanych dla preadipocytów i fibroblastów skórnych. Rozumiem, że temat pracy nie dotyczył ich bezpośrednio, ale skoro były jednym z modeli badawczych i znalazło się miejsce dla nich w metodyce, w suplemencie zawierającym wyniki, to uważam, że choć jeden wniosek powinien ich dotyczyć.

Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest dziełem poruszającym ważne z punktu naukowego kwestie dotyczące procesu starzenia się komórek i roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odniesieniu do zmian funkcji limfocytów T. Uzyskane wyniki przedstawione we wnioskach stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka dowodzi w rozprawie dużej swej wiedzy merytorycznej oraz co najmniej równie wysokimi umiejętnościami eksperymentalnymi. Mimo kilku moich w/w uwag, walory naukowo-poznawcze rozprawy są wysokie.

Z całą pewnością, przedstawione mi do oceny dzieło spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, 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. Agaty Głuchowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Poznań, 06 grudnia 2023 r.



Justyna Mikuła-Pietrasik



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII

dr hab. n. med. Małgorzata Czystowska-Kuźmich
Katedra i Zakład Biochemii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
email: mzzystowska@wum.edu.pl

Warszawa, 18.12.2023

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. AGATY GŁUCHOWSKIEJ P.T. „PĘCHERZYKI ZEWNĄTRZ-KOMÓRKOWE ORAZ BIAŁKA WYDZIELANE PRZEZ STARE KOMÓRKI MIĘŚNI GŁADKICH AORTY – WPŁYW NA FUNKCJE LIMFOCYTÓW T”

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Głuchowskiej wykonana została pod kierunkiem promotora głównego - Pani dr hab. Grażyny Mosieniak w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Projekt doktorski realizowany był ramach kierowanego przez dr hab. Grażynę Mosieniak grantu Opus finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr.: UMO 2014/15/B/NZ3/01150), w którym Doktorantka pełniła rolę wykonawcy. Wynikiem przedstawionych w niniejszej rozprawie badań była oryginalna praca w recenzowanym czasopiśmie Geroscience o IF: 7,581.

W ostatnich latach starzenie komórkowe stanowi istotny przedmiot badań wielu grup badawczych na świecie z uwagi na jego rolę w rozwoju chorób związanych z wiekiem, takich jak choroby naczyniowo-sercowe, choroby neurodegeneracyjne, zaćma i jaskra, cukrzyca typu II, przewlekła obturbacyjna choroba płuc, itd. Szczególne zainteresowanie badawcze wzbudza tzw. fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem (z ang. Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) charakterystyczny dla wszystkich komórek ulegających starzeniu. Jest on istotnym czynnikiem patologicznych procesów starzenia, w tym przewlekłego stanu zapalnego, immunosupresji, transformacji nowotworowej czy upośledzonej regeneracji. Ostatnie badania sugerują, że istotnym składnikiem sekretomu związanego z SASP, obok rozpuszczalnych białkowych i nie-białkowych cząsteczek sygnałowych, są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. extracellular vesicles, EVs), spełniających rolę mediatorów międzykomórkowych, zarówno w mikrośrodkowisku jak i

ogólnieustrojowo. Wykazano, że w odpowiedzi na różnorakie bodźce indukujące starzenie komórki wydzielają więcej EVs. Mikropecherzyki te odzwierciedlają zmiany molekularne zachodzące w komórkach ulegających starzeniu i istotnie wpływają na mikrośrodowisko komórek starych, m.in. przyczyniając się do starzenia sąsiadujących komórek i promując stres oksydacyjny i stan zapalny. Podobny wpływ SASP, szczególnie dotyczący promocji stanu zapalnego, udokumentowano w rozwoju miażdżycy. W obrębie blaszki miażdżycowej wykryto obecność starych komórek mięśni gładkich aorty (z ang. senescent vascular smooth muscle cells, VSMCs) i udokumentowano niekorzystny wpływ ich sekretomu na mikrośrodowisko blaszki, jednakże rola EVs w obrębie tego sekretomu była do tej pory mało poznana.

Praca doktorska pani Agaty Głuchowskiej podejmuje ten słabo zbadany temat SASP, w tym EVs, z komórek VSMC ulegających starzeniu. W starannie zdefiniowanych modelach *in vitro* z użyciem linii komórek zdrowych VSMC, fibroblastów i preadipocytów, doktorantka zidentyfikowała istotne markery indukowanego starzenia przyspieszonego indukowanego stresem (SPIS) a także starzenia replikacyjnego (RS), które następnie wykorzystała do wykazania cech starzenia komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych jako modelu starzenia *in vivo*. Wykazała podobieństwa w morfologii, w ekspresji białek związanych ze starzeniem oraz w sekretomie komórek VSMC ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo*. Stwierdziła przy tym, że profil wydzielniczy komórek VSMC izolowanych z blaszek miażdżycowych w znacznym stopniu przypomina profil wydzielniczy komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu. Dzięki analizie proteomicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz czynników rozpuszczalnych związanych z SASP doktorantka wykazała różnice w składzie sekretomu komórek młodych i starych, jak i pomiędzy komórkami ulegającymi starzeniu przyspieszonemu oraz replikacyjnemu. W kolejnym modelu *in vitro* wykazała zróżnicowany wpływ poszczególnych frakcji SASP starych komórek VSMC: pęcherzykowej oraz rozpuszczalnej, na aktywację limfocytów T, co może mieć bezpośredni wpływ na rozwój stanu zapalnego bezpośrednio blaszkach miażdżycowych *in vivo*.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa mgr inż. Agaty Głuchowskiej jest klasyczną dysertacją i jest dość obszerna, licząc 196 stron. Ma układ typowy dla rozpraw doktorskich i w pełni spełnia wymogi formalne stawiane rozprawie doktorskiej. Rozprawę rozpoczyna Spis treści i wykaz wybranych skrótów, po którym następują streszczenia pracy w języku polskim oraz angielskim. Wstęp, liczący 22 stron i obejmujący 2 ryciny, podzielony został na 11 podrozdziałów i jest merytorycznym wstępem do podejmowanych w rozprawie doktorskiej aspektów badawczych. W następującym dwustronicowym rozdziale zatytułowanym Założenia i cele Doktorantka sformułowała najważniejsze cele swojej rozprawy doktorskiej. Rozdział Materiały i Metody liczący 28 stron zawiera opis materiału badawczego oraz procedur eksperymentalnych zastosowanych w pracy i jest uzupełniony o 7 rycin oraz 5 tabel odnoszących się do przeprowadzonych procedur doświadczalnych oraz odczynników wykorzystanych w badaniach. Bardzo obszerny rozdział obejmujący główne wyniki badań uzyskanych przez Doktorantkę liczy 71 stron, został podzielony na 4 główne podrozdziały i zawiera 56 rycin i 2 tabele. Zaznaczyć należy, że rozdział ten został też uzupełniony o liczący 14 stron suplement umieszczony na końcu pracy, który za pomocą 13 rycin i 1 tabeli przedstawia uzupełniające wyniki pracy. Następująca 19-stronicowa Dyskusja podzielona została na 5 podrozdziałów omawia przedstawione wcześniej wyników na tle dotychczasowych doniesień naukowych. Kolejny 2-stronicowy rozdział podsumowuje

najważniejszy wyniki badań przeprowadzonych i wyciągnięte wnioski. Praca doktorska kończy się rozdziałem obejmującym spis piśmiennictwa liczącego 223 pozycji, listą publikacji Doktorantki oraz wspomnianym wyżej Suplementem.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca doktorska jest napisana bardzo poprawnym, rzeczowym a zarazem przystępnym językiem polskim. Pod względem edytorskim praca jest przygotowana bardzo starannie i estetycznie, zawiera bardzo nieliczne i drobne błędy edytorskie które nie umniejszają w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy. Grafiki są dobrze zaplanowane i jasno i przejrzysto prezentują uzyskane wyniki. Wszystko to sprawia, że pracę czyta się z dużą przyjemnością, jasno podążając za tokiem prezentacji danych przez Doktorantkę.

Ocena merytoryczna

Wstęp napisany jest w sposób przejrzysty i spójny, dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W pierwszych 5 podrozdziałach Doktorantka przedstawia zagadnienia starzenia komórkowego na poziomie molekularnym, omawiając jego definicję, jego główne typy, jak i szlaki sygnałowe które zostają indukowane w trakcie tego procesu. Szczególną uwagę Doktorantka poświęca omówieniu najważniejszych morfologicznych i molekularnych znaczników starzenia komórkowego, które będą następnie wykorzystywane w pracy badawczej, podkreślając przy tym brak jednego uniwersalnego markera komórek starych. W tym kontekście w szczególności omawia tzw. fenotyp wydzielniczy związanego ze starzeniem (z ang. SASP), w tym jego działanie na inne komórki mikrośrodowiska. Doktorantka zwraca przy tym uwagę na złożoność i różnorodność tego procesu oraz jego zmienną dynamikę, co uzmysławia czytelnikowi trudności z jakimi zmagala się Doktorantka badając to zjawisko oraz tłumaczy zastosowanie przez nią określonych modeli *in vitro* (wczesne vs. późne starzenie). Następnie Doktorantka przedstawia pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako niedawno odkryty nowy element sekretomu komórek starych. Pokrótce omawia ich definicję, klasyfikację, biogenezę i interakcje z innymi komórkami, a także ich dotychczas udokumentowane znaczenie w starzeniu komórkowym. W kolejnej części składającej się z 6 podrozdziałów Doktorantka omawia rolę starzenia komórkowego dla całego organizmu, w tym jego związek z rozwojem chorób związanych z wiekiem, koncentrując się tutaj na miażdżycy. Omawia patogenezę blaszki miażdżycowej i rolę poszczególnych typów komórek w jej rozwoju, w szczególności rolę komórek mięśni gładkich, stanowiących przedmiot badań niniejszej pracy. Przedstawia doniesienia dokumentujące proces starzenia komórek mięśni gładkich w obrębie blaszki miażdżycowej, które poprzez wydzielanie czynników związanych z SASP oddziałują na inne komórki w mikrośrodowisku blaszki, takie jak np. limfocyty. Prowadzi to do promocji stanu zapalnego i destabilizacji blaszki, pogłębiając zmiany miażdżycowe.

Do tej części mam jedynie kilka de facto drobnych uwag i pytań:

Na str. 26 Doktorantka pisząc o odkryciu, że EVs mogą dostarczać funkcjonalne RNA i białka do komórek biorców przytacza pracę Valadi i wsp. z 2007. Należy wspomnieć, że za pierwszą pracę dokumentującą niezbicie biologiczną funkcję EVs związaną z transportem białek jest praca Raposo i wsp. z 1996 r., opisując transfer receptorów MHC-II z komórek B do limfocytów T, zaś funkcjonalny transfer mRNA poprzez EVs został jako pierwszy opisany przez prof. Ratajczaka w 2006 r.

Doktorantka stwierdza na str. 28 w związku z omawianiem różnych szlaków pochłaniania EVs przez komórki, że „...fagocytoza stanowi raczej środek eliminacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych aniżeli proces pośredniczący w komunikacji między komórkami.” Tu bym polemizowała, gdyż niezależnie od drogi wychwytu/internalizacji EVs trafiają one do wczesnych endosomów i dopiero po tym etapie mogą trafić na ścieżkę degradacji do lizosomów lub, jak wykazano w licznych pracach, często mogą uniknąć ścieżki degradacji, naśladując np. mechanizmy ucieczki wypracowane przez bakterie i wirusy (tzw. „endosomal escape”, np. Groth and Marsh, 2011; Tweten 2005). Wielokrotnie udokumentowany funkcjonalny transfer białek i RNA poprzez fagocytowane EVs do makrofagów, niezbiecie dowodzi możliwości istnienia transportu mikropęcherzykowego ładunku molekularnego do cytoplazmy z ominięciem ścieżek degradacji również w przypadku fagocytozy, choć dokładne mechanizmy tej ucieczki nie są jeszcze dostatecznie zbadane.

Na str.33 Doktorantka wspomina, że komórki mięśni gładkich znajdują się w czapeczce, jednak dokładniejsze wyjaśnienie tego elementu blaszki miażdżycowej, mechanizmu jego powstania i znaczenie dla stabilizacji blaszki opisuje dopiero w następnym rozdziale dotyczącym stanu zapalnego. Połączenie obu fragmentów polepszyłoby zrozumienie zjawiska przez czytelnika pracy. W tym kontekście dodatkowa grafika ilustrująca w uproszczeniu mechanizmy i typy komórek zaangażowane w rozwój blaszki miażdżycowej znacznie ułatwiłyby zrozumienie przez czytelnika tego skomplikowanego procesu.

Materiały i metody:

Tutaj Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje zastosowane linie komórkowe, przeciwciała, roztwory, modele *in vitro* i *ex vivo*. Na podkreślenie zasługuje różnorodność zastosowanych technik badawczych. Zabrakło mi tu jednak kilku informacji, a także mam dość istotną uwagę dotyczącą doboru metody izolacji EVs z pożywki.

W rozdziale 3.1.1.2 Doktorantka opisuje izolację ludzkich komórek mięśni gładkich z blaszek miażdżycowych. Jak pozbywano się zanieczyszczeń komórkami nabłonka i fibroblastami? Czy sprawdzano czystość uzyskanych komórek mięśni gładkich, np. w cytometrii przepływowej?

Brak jest zupełnie informacji związanych z dawcami blaszek miażdżycowych: o ich wieku, czynników miażdżycy takich jak hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, otyłość, palenie papierosów, itp., morfologii blaszek miażdżycowych, stosowanego leczenia. Mimo bardzo ograniczonej grupy badawczej nie gwarantującej zapewne istotności statystycznej uzyskanych wyników, dane te mogłyby pomóc zinterpretować zauważalne różnice w sekretomie komórek mięśni gładkich poszczególnych dawców oraz wskazać przynajmniej jakieś trendy związane z czynnikami klinicznymi.

Z uwagi na moje wieloletnie doświadczenie w izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ale w szczególności w świetle publikacji Wallis i wsp. z 2020 r. (JEV. 2021;10:e12041. <https://doi.org/10.1002/jev2.12041>) uważam wybór przez Doktorantkę akurat ultrawirowania jako metody izolacji pęcherzyków z pożywki hodowlanej za dość niefortunny. Szczególnie w przypadku analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bardzo czułą metodą proteomiczną, niezwykle ważna jest czystość analizowanych próbek aby uzyskać wiarygodne wyniki. Tym bardziej że Doktorantka zamierzała jakościowo i ilościowo porównać sekretom starzejących się komórek mięśni gładkich związanych z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi z sekretomem rozpuszczalnym, co wymagałoby jak najbardziej

precyzyjnego oddzielenia frakcji pęcherzykowej od frakcji rozpuszczalnej. Zastosowanie ultrawiórowania sekwencyjnego jako jedynej metody izolacji wg licznych doniesień nie gwarantuje bynajmniej takiego rozdziału, a wymieniona wyżej praca poświęcona była właśnie temu zagadnieniu w kontekście badania fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem w fibroblastach. Stosując analizy proteomiczne i testy ELISA badacze wykazali, że rozpuszczalne czynniki SASP ulegają ko-izolacji z pożywki kondycjonowanej razem z EVs po ultrawiórowaniu. Dowiedli, że zastosowanie dodatkowego oczyszczania próbek po izolacji ultrawiórowaniem metodą chromatografii wykluczania (z ang. SEC, size exclusion chromatography) zapewnia skuteczny rozdział frakcji pęcherzykowej i rozpuszczalnej SASP i umożliwia wiarygodną analizę funkcjonalnej roli obu frakcji w starzeniu komórkowym. Nie wiem, czy Doktorantka w momencie planowania i przeprowadzania etapu izolacji EVs była świadoma istnienia tej publikacji, czy rozważała stosowanie innych lub uzupełniających metod izolacji. Prosiłabym tu o stosowny komentarz. Tym niemniej zaznaczyć należy, że prezentowane w tej rozprawie przez Doktorantkę wyniki proteomicznej analizy pęcherzykowej i rozpuszczalnej frakcji SASP zostały opublikowane w dobrym czasopiśmie i tutaj recenzenci najwyraźniej nie mieli takich zastrzeżeń.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka w sposób bardzo logiczny i uporządkowany przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań, ilustrując je odpowiednio dobrze opisanymi, wielopanelowymi rycinami i tabelami.

W pierwszej części scharakteryzowano i porównano fenotyp starzenia przyspieszonego ludzkich komórek mięśni gładkich aorty, preadipocytów oraz fibroblastów (SIPS) oraz starzenia replikacyjnego (RS) komórek mięśni gładkich aorty. Doktorantka zidentyfikowała przy tym uniwersalne markery starzenia, pozwalające jednoznacznie odróżnić komórki stare nie tylko od komórek proliferujących, ale także od tych będących w stanie spoczynku. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka nie zawierzyła ślepo publikowanym danym na temat stosowanych markerów starzenia, lecz krytycznie zweryfikowała ich użyteczność dla własnego modelu badawczego. Następnie scharakteryzowała i porównała starzenie replikacyjne i przyspieszone ludzkich komórek mięśni gładkich aorty na wczesnym i późnym etapie tego procesu. Udokumentowała tym samym dynamikę procesu starzenia, pokazując że pewne badane cechy fenotypu starzenia zmieniały się w czasie. Analizując podobnie komórki mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych, Doktorantka potwierdziła wcześniejsze doniesienia że komórki te są wzbogacone o populację komórek starych, świadczące o procesie starzenia w mikrośrodku blaszki. Wykazała, że komórki mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych charakteryzują się zwiększonym wydzielaniem białek związanych z SASP i że ich profil wydzielniczy w znacznym stopniu przypomina sekretom komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu. Doktorantka zauważa jednak, że stwierdzone różnice w ekspresji białek p21 i p16 w komórkach z blaszek miażdżycowych w stosunku do komórek hodowanych in vitro świadczą też o pewnych różnicach pomiędzy procesem starzenia zachodzącego w warunkach hodowli in vitro a procesem w organizmie.

W kolejnym etapie badań Doktorantka zbadała sekretom komórek mięśni gładkich aorty o fenotypie RS i SIPS pod kątem zawartości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i wykryła zwiększone wydzielanie pęcherzyków przez komórki stare, niezależnie od fenotypu starzenia. Poprzez analizę proteomiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz czynników rozpuszczalnych związanych z SASP Doktorantka wykazała różnice w składzie sekretom komórek młodych i starych, jak i pomiędzy dwoma badanymi fenotypami starzenia (RS vs SIPS). Ponadto zidentyfikowała szereg białek, które mogą regulować funkcje

komórek odpornościowych, takich jak np. trombospodyna. Stąd też w kolejnym kroku Doktorantka zbadala wpływ czynników SASP na aktywację, migrację i produkcję cytokin limfocytów T. Pożywka kondycjonowana, reprezentująca wszystkie wydzielane czynniki SASP przez komórki ulegające starzeniu, zwiększała ilość wydzielanych cytokin przez aktywowane limfocyty w stosunku do pożywki znad komórek kontrolnych. Powtórzenie tego eksperymentu z podziałem na pęcherzykową oraz rozpuszczalną frakcję czynników SASP wykazało jednakże zróżnicowany, wręcz antagonistyczny wpływ obu frakcji na wydzielanie cytokin przez aktywowane limfocyty T.

Do tego rozdziału mam kilka pytań i uwag:

Czy Doktorantka porównywała proteom frakcji pęcherzowej i rozpuszczalnej SASP? Analiza udziału procentowego i rodzaju zidentyfikowanych białek wspólnych (np. czy były to głównie białka wydzielnicze?) mogłaby wyjaśnić, czy tak jak w przypadku wspomnianej przeze mnie pracy Wallis i wsp. mamy tu do czynienia z ko-izolacją rozpuszczalnych czynników SASP z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi metodą ultrawierowania.

W badaniach wpływu pożywki kondycjonowanej na aktywowane limfocyty T (ryc. 4.48-4.51) w przypadku komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych prosiłabym Doktorantkę o doprecyzowanie, czy użyto komórek od jednego czy wielu dawców i na jakiej zasadzie dokonano wyboru.

Doktorantka w związku z wizualizacją pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez limfocyty T wspomina o ich internalizacji. W mojej ocenie, przedstawione w pracy zdjęcia nie dowodzą jednoznacznie faktu pobierania pęcherzyków a jedynie wskazują na powierzchowną interakcję. Czy Doktorantka przeprowadziła również kontrolny eksperyment w 4°C lub zmierzyła ewentualną internalizację innymi metodami, np. w cytometrii przepływowej? Według doniesień literaturowych limfocyty T raczej niechętnie pobierają mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe w porównaniu do innych typów komórek i ich interakcje opierają się raczej na aktywacji błonowych receptorów na powierzchni limfocytów poprzez odpowiednie ligandy na pęcherzykach (np. FasL, PD-L1). Czy w zidentyfikowanym proteomie pęcherzyków komórek ulegających starzeniu Doktorantka wykryła tego typu ligandy?

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka bardzo starannie ocenia uzyskane wyniki na tle innych danych literaturowych, dogłębnie i krytycznie analizując także swoje kontrowersyjne i nieoczekiwane wyniki. Na szczególne uznanie zasługuje ostrożne i wyważone wnioskowanie na podstawie otrzymanych wyników, przy jednoczesnej doskonałej znajomości literatury i szerokiej wiedzy w temacie. Rozdział czyta się bardzo dobrze, gdyż został podzielony na podrozdziały odnoszące się do odpowiednich podrozdziałów opisujących wyniki, a ponadto Doktorantka bardzo dobrze przedstawiła związki przyczynowo skutkowe przeprowadzonych eksperymentów. Szczegółowo tłumaczy dlaczego w swoich badaniach zastosowała te konkretnie rodzaje komórek, induktorów i modeli starzenia. Niemalże wszystkie pytania i wątpliwości, jakie nasuwały się czytelnikowi w trakcie lektury wyników, Doktorantka wyjaśniła w odpowiedniej części dyskusji.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Agaty Głuchowskiej oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji uwagi oraz pytania w żadnym stopniu nie wpływają na moją jak najbardziej

pozytywną ocenę rozprawy. Doktorantka podjęła bardzo ciekawy i ważny badawczo i klinicznie temat, a jej badania wpisują się w najnowsze trendy analizy roli starzenia komórkowego oraz mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w miażdżycy. Staranne zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń z zastosowaniem różnorodnych technik a także dogłębna i wyważona analiza uzyskanych wyników świadczy o znakomitym opanowaniu warsztatu badawczego i dojrzałości naukowej Doktorantki.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim 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 z przyjemnością wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Agatę Głuchowską do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

z poważaniem,

KIEROWNIK
Pracowni Mikropęcherzyków
w Katedrze i Zakładzie Biochemii
M. Czystowska-Kuźmick
dr. hab. n. med. Małgorzata Czystowska-Kuźmick

