

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Alicji Targońskiej
pod tytułem
„Starzenie komórek mięśni gładkich aorty - związek między autofagią a sekrecją
pęcherzyków zewnątrzkomórkowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Grażyny Mosieniak, prof. Instytutu PAN w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia oraz w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Badania zaprezentowane w pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus kierowanego przez Panią dr hab. Grażynę Mosieniak pt. „*Rola autofagii w regulacji wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz białek przez komórki mięśni gładkich naczyń na różnych etapach procesu starzenia*” (2018/31/B/NZ3/02931), w którym Doktorantka pełniła rolę wykonawcy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska podejmuje problematykę, która bez wątpienia wpisuje się w nurt najbardziej aktualnych i kluczowych wyzwań współczesnej biologii medycznej oraz gerontologii molekularnej. Wybór tematu badawczego, koncentrującego się na mechanizmach starzenia komórkowego oraz komunikacji parakrynej, należy uznać za w pełni uzasadniony i wysoce trafny. Praca ta wnosi istotny wkład poznawczy w rozumienie dynamiki starzenia naczyń krwionośnych, skupiając się na komórkach mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMC), których dysfunkcja stanowi fundament patogenezy chorób układu krążenia. Doktorantka słusznie identyfikuje starzenie komórkowe nie jako stan statyczny, lecz jako proces wysoce dynamiczny i wieloetapowy. Wyjątkową wartością poznawczą pracy jest dokonanie nowatorskiego porównania między starzeniem replikacyjnym a indukowanym stresem, z precyzyjnym uwzględnieniem różnic między fazą wczesną a późną. Kluczowym walorem naukowym dysertacji jest wykazanie bezpośredniego związku między obecnością starzejących się komórek VSMC a procesami destabilizacji blaszki miażdżycowej.

Ocena formalna

Struktura przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Targońskiej jest w pełni poprawna, logiczna i wykazuje wysoką dbałość o warsztat naukowy. Podział treści

odzwierciedla klasyczny model wyvodu naukowego, co pozwala na przejrzyste śledzenie procesu badawczego – od podstaw teoretycznych, przez rygorystyczny opis metodyki, aż po szczegółową prezentację wyników i ich krytyczną interpretację. Układ treści potwierdza, że formalnie praca jest **typową monografią naukową**, przygotowaną zgodnie z tradycyjnymi wymogami stawianymi dysertacjom doktorskim. Dodatkowo dysertacja zawiera niezbędne elementy formalne, takie jak wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Ocena merytoryczna

Wstęp teoretyczny dysertacji stanowi dojrzałe i wyczerpujące wprowadzenie w problematykę badawczą, wykazując pełną spójność z tytułem oraz zakresem merytorycznym pracy. Doktorantka w sposób kompetentny nakreśliła szeroki kontekst biologiczny starzenia komórkowego, płynnie przechodząc od ogólnych mechanizmów senescencji (replikacyjnej i indukowanej przez stres) do szczegółowych aspektów patofizjologii naczyń krwionośnych. Konstrukcja wstępu jest logiczna i zorientowana na cel, co pozwala czytelnikowi na pełne zrozumienie biologicznego znaczenia badanych procesów. W zakresie kompletności wprowadzenia, Doktorantka szczegółowo omówiła kluczowe filary pracy: fenotyp sekrecyjny (ang. *senescence-associated secretory phenotype*, SASP), biogenezę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) oraz proces autofagii. Każdy z tych elementów został przedstawiony nie tylko jako odrębne zjawisko, ale przede wszystkim w kontekście ich wzajemnych korelacji, co jest niezbędne dla zrozumienia postawionej hipotezy badawczej. We wstępie położono także szczególny nacisk na omówienie roli komórek mięśni gładkich aorty oraz ich udziału w stabilności blaszki miażdżycowej, co wyraźnie osadza badania w problematyce sercowo-naczyniowej.

Pani mgr Targońska prawidłowo zidentyfikowała luki w dotychczasowej wiedzy naukowej. Doktorantka słusznie punktuje niedostateczny stan wiedzy na temat dynamiki zmian zachodzących w czasie procesu starzenia (rozdzielenie na fazę wczesną i późną) oraz brak jasnych danych dotyczących wpływu autofagii na profil wydzielniczy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w starych komórkach VSMC. Wskazanie na te deficyty poznawcze stało się silnym i przekonującym uzasadnieniem dla podjęcia badań własnych oraz sformułowania hipotezy. Uzasadnienie potrzeby przeprowadzenia badań zostało sformułowane w sposób rzetelny i wieloaspektowy. Doktorantka trafnie argumentuje, że lepsze poznanie sekretomu komórek starzejących się może przyczynić się do odkrycia nowych biomarkerów

diagnostycznych oraz celów terapeutycznych w leczeniu miażdżycy. Wykazanie potencjału aplikacyjnego wyników, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego poziomu analizy podstawowych mechanizmów biologicznych, świadczy o dużej świadomości naukowej autorki. Podsumowując, wstęp rozprawy jest kompletny, merytorycznie poprawny i stanowi solidny fundament teoretyczny, który w pełni uzasadnia celowość podjętych wysiłków badawczych. Podczas obrony publicznej kilka kwestii omawianych we wstępie wymaga jednak wyjaśnienia lub doprecyzowania.

- W sekcji 1.3, Doktorantka w części dotyczącej omawiania IL-1 α wspomina o kaspazie 5 lub 11. W kontekście komórek człowieka kluczowe są kaspazy 1, 4 i 5. Kaspaza 11 jest charakterystyczna dla myszy (ortolog ludzkich kaspaz 4/5). Warto doprecyzować gatunek.
- Fragment dotyczący „przemieszczania się z powierzchni komórki do jądra” jest mało precyzyjny. IL-1 α występuje w formie związanej z błoną lub prekursorowej w cytoplazmie; jej forma związana z chromatyną faktycznie działa w jądrze (dokładnie system IL-1 w jądrze obejmuje prekursorową postać interleukiny 1), ale sformułowanie o „przemieszczaniu się z powierzchni” sugeruje ruch z zewnątrz do środka, co nie jest zgodne z obecnym stanem wiedzy.
- W pracy opisano FKBP12 jako receptor podczas gdy FKBP12 jest immunofiliną (chaperonem), a nie receptorem w klasycznym tego słowa znaczeniu.
- Zdanie „Ścieżka aktywowana cytozolem DNA, w której uczestniczą białka cGAS-STING reguluje SASP w odpowiedzi na działanie interferonu.” sugeruje, że to interferon aktywuje cGAS-STING. W rzeczywistości jest odwrotnie: to aktywacja cGAS-STING przez cytozole DNA prowadzi do produkcji interferonów typu I (IFN) i innych czynników SASP.
- W rozdziale 1.5 podano datę „druga połowa lat 40. XIX w.” Erwin Chargaff prowadził te badania w latach 40. XX wieku.
- W tekście dysertacji wspomniano o wytycznych ISEV z 2011 roku. Warto jednak zaznaczyć (lub uaktualnić), że najnowsze wytyczne MISEV 2023 (<https://doi.org/10.1002/jev2.12404>) (oraz wcześniejsze 2018) kładą ogromny nacisk na to, by unikać terminów „egzosomy” i „mikropęcherzyki” w odniesieniu do wyizolowanych cząstek, jeśli nie potwierdzono ich biogenezy. Zaleca się stosowanie terminów opartych na wielkości: małe EVs (sEVs) i duże EVs (IEVs). Tekst o tym

wspomina, ale brak w nim pewnej konsekwencji, w efekcie czego Doktorantka podczas omawiania tej tematyki operuje nomenklaturą wcześniej stosowaną na przemian z nową.

- W rozdziale 1.6.1 doktorantka wspomina o PAS. Należy jednak zaznaczyć, że w komórkach ssaków PAS jest pojęciem nieco dyskusyjnym – częściej używa się określenia omegasom (struktura powstająca z retikulum endoplazmatycznego). PAS jest terminem wywodzącym się z badań nad drożdżami. Warto mieć to na uwadze, gdyż badania prowadzone w ramach niniejszej pracy były na komórkach ssaczych.

Przedstawiony cel pracy doktorskiej jest osadzony w aktualnych nurtach badawczych biologii komórki, łącząc klasyczną gerontologię z nowoczesną analizą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i autofagii. Cele szczegółowe są sformułowane w sposób konkretny; wykorzystanie zaawansowanych narzędzi, takich jak analiza transkryptomu i proteomu, nadaje pracy charakter kompleksowy (tzw. podejście „omiczne”), co jest obecnie standardem w naukach biologii eksperymentalnej. Pod względem strukturalnym cele logicznie wynikają z nakreślonego we wstępie tła klinicznego, tworząc spójny ciąg od obserwacji fenotypowych po poszukiwanie mechanizmów regulacyjnych (rola autofagii).

Podsumowując, sformułowany cel naukowy spełnia 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.

Rozdział „Materiały i Metody” jest przygotowany na bardzo wysokim poziomie szczegółowości, co w kontekście pracy doktorskiej jest kluczowe dla zapewnienia powtarzalności badań. Doktorantka precyzyjnie opisała każdy aspekt warsztatu badawczego, od pochodzenia linii komórkowych, przez skomplikowane receptury buforów, aż po zaawansowane procedury mikroskopowe itd. Przedstawiony opis metod i technik badawczych jest wyjątkowo skrupulatny i w pełni umożliwia ich odtworzenie przez innego badacza, co stanowi fundament rzetelnej metodologii naukowej. Sekcja dotycząca hodowli komórkowej (3.1.1) zawiera nie tylko nazwę linii i dostawcy (ATCC), ale również kompletny skład pożywki wraz ze stężeniami suplementów oraz precyzyjne parametry inkubacji. Szczególnie wartościowe są tabele (3.1 i 3.2) zawierające wykaz przeciwciał; podanie nie tylko producentów i rozcienceń, ale także mas białek, pochodzenia przeciwciał oraz specyficznych

buforów blokujących, eliminuje najczęstsze źródło błędów w technice Western blot. Podobną precyzję widać w zestawieniu odczynników chemicznych (Tabela 3.3), gdzie uwzględniono rozpuszczalniki i stężenia roztworów wyjściowych. Opis procedur związanych z mikroskopią elektronową (3.2.8) zasługuje na wyróżnienie ze względu na swoją kompleksowość – uwzględnienie etapów odwadniania, składu użytych odczynników oraz precyzyjnych czasów i temperatur inkubacji (np. inkubacja z asparaginianem ołowiu Waltona w 60°C) pozwala na wierne odtworzenie przygotowania preparatów ultrastrukturalnych. Również opisy metod analitycznych, takich jak wyznaczanie indeksu autofagicznego (3.2.3) czy skumulowanej liczby podwojeń populacji (3.2.1), są jasne i wzbogacone o wzory matematyczne, co usuwa pole do interpretacji wyników. Metodyka barwień immunocytochemicznych (3.2.7) i cytochemicznych (3.2.6) zawiera krytyczne informacje o czasach utrwalania, stężeniach detergentów (Triton X-100) oraz użyciu specyficznego oprogramowania do analizy obrazu (ImageJ, NIS Elements), co domyka proces badawczy od eksperymentu do kwantyfikacji danych. Jedynym drobnym elementem, który można by uzupełnić dla pełnej perfekcji, jest podanie numerów katalogowych wszystkich przeciwciał (choć nazwa producenta i antygeny zazwyczaj wystarcza do ich identyfikacji). Należy tym samym podkreślić, że rozdział ten jest wzorcowym przykładem dokumentacji laboratoryjnej, łączącym rygor techniczny z przejrzystością struktury. Należy też podkreślić, że Doktorantka wykazuje się biegłością w łączeniu klasycznych technik izolacji z zaawansowanymi technologiami „omicznymi” (RNAseq, proteomika LC–MS/MS, znakowanie TMTpro).

Przy tak szczegółowym opisie technologicznym wkradło się jednak kilka nieścisłości, które warto wyjaśnić w tym miejscu.

- Doktorantka zastosowała określenie „3% roztwór żelazo (II) cyjanku potasu” (rozdział 3.1.3.6.) poprawna polska nazwa to żelazocyjanek potasu lub heksacyjanożelazian(II) potasu.
- W zakresie wyznaczania indeksu autofagicznego (Sekcja 3.2.3) doktorantka nie zdefiniowała normalizacji. Wzór sugeruje porównanie stosunku LC3B II/I. Jednakże zgodnie z wytycznymi *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy* uważa się, że LC3B-II należy normalizować do białka referencyjnego (np. GAPDH), a nie do LC3B-I. Wynika to z faktu, że forma LC3B-I jest często mniej stabilna, słabiej wykrywana przez przeciwciała lub jej poziom drastycznie spada przy silnej indukcji autofagii, co sztucznie zawyża wynik indeksu.

- Doktorantka podaje: "najpierw ultrawirowano przez 30 minut przy prędkości 10000 x g". Formalnie 10000×g to wirowanie przy dużej prędkości, a nie ultrawirowanie. Ultrawirowanie zaczyna się zazwyczaj >20000×g. Taki opis wskazywać może, że choć użyto ultrawirówki, terminologicznie etap 10000×g posłużył do usuwania dużych pęcherzyków (mikropęcherzyków) i fragmentów komórek, a nie właściwego osadzania małych EVs (egzosomów). Warto sprawdzić, czy jest to błąd edytorski czy faktycznie wykorzystano technikę wirowania przy dużej prędkości.
- W opisie syntezy drugiej nici cDNA podano, że uzyskuje się strukturę hybrydową, która jest przekształcana w dwuniciowe cDNA z włączeniem dUTP. To prawda, ale brakuje kluczowej informacji: aby zachować specyficzność niciową, matryca RNA musi zostać zdegradowana (zazwyczaj przez RNazę H) przed syntezą drugiej nici. Bez tego opisu proces wydaje się niekompletny.
- Doktorantka napisała: „*Ilości peptydów EVs nie wyrównywano przed znakowaniem (...) przyjmując, że pomiędzy badanymi grupami mogą występować istotne różnice w składzie*”. To podejście jest ryzykowne merytorycznie. W metodzie TMT, jeśli jedna próba ma 10 µg, a druga 37 µg peptydów, sygnał z kanałów reporterowych będzie drastycznie różny, co może prowadzić do błędów normalizacji matematycznej i „wypchnięcia” słabszych próbek poza zakres czułości spektrometru. Standardowo wyrównuje się ilości białka, a różnice w sekrecji analizuje się jako osobny parametr (ilość EVs/komórkę).

Rozdział 4 „Wyniki” oceniam jako bardzo wartościowy z punktu widzenia recenzenta, zarówno pod względem merytorycznym, metodologicznym, jak i sposobu prezentacji danych. Rozdział ten stanowi trzon pracy, wykazując głębokie powiązanie między procesami wewnątrzkomórkowymi (autofagia, DDR) a komunikacją zewnątrzkomórkową (SASP, EVs). Rozdział został zaplanowany w sposób przemyślany i sekwencyjny. Jak już wcześniej wspominałem przedstawiona w dysertacji strategia badawcza zasługuje na wysoką ocenę, przede wszystkim ze względu na kompleksowe i wielowymiarowe podejście do zjawiska starzenia komórkowego. Doktorantka słusznie identyfikuje starzenie jako proces dynamiczny a wyodrębnienie etapu wczesnego (SIPS I) oraz późnego (SIPS IV) pozwoliło na precyzyjne prześledzenie ewolucji fenotypu starzeniowego, co stanowi istotną wartość dodaną pracy. Wykorzystanie doksorubicyny jako induktora starzenia przyspieszonego jest metodą dobrze ugruntowaną w literaturze przedmiotu, a

odwołanie się do wcześniejszych optymalizacji zespołu badawczego (potwierdzających brak wpływu na żywotność przy jednoczesnym hamowaniu proliferacji) dowodzi rzetelności w przygotowaniu modelu. Równoległe zestawienie modelu SIPS z modelem replikacyjnym (RS) nadaje uzyskanym wynikom charakter uniwersalny i pozwala na szerszą interpolację wniosków. Doktorantka rozpoczyna od fundamentalnej charakterystyki modeli starzenia (SIPS i RS), co stanowi niezbędną bazę do dalszych, bardziej zaawansowanych analiz. Przejście od zmian morfologicznych, przez markery molekularne, aż do kompleksowych badań proteomicznych i funkcjonalnych (autofagia), pozwala czytelnikowi na płynne zrozumienie dynamiki badanego procesu. Najsilniejszą stroną tego rozdziału jest multidyscyplinarne podejście do weryfikacji postawionych hipotez. Doktorantka nie polega na jednej metodzie, lecz stosuje podejście kompleksowe do weryfikacji wyników.

Ewaluacja zmian morfologicznych została przeprowadzona w sposób szczegółowy i jest w pełni zgodna z klasycznymi cechami procesu starzenia komórkowego, takimi jak rozpląszczenie komórek, powiększenie jąder oraz głęboka przebudowa cytoszkieletu. Szczególną uwagę zwraca obserwacja „opalizujących struktur wypełnionych aktyną” (interpretowanych jako fragmenty komórek), co sugeruje postępujące w czasie zmiany w adhezji lub fragmentację dystalnych części wypustek, nasilającą się w stadium SIPS IV. Analiza ultrastrukturalna, wykonana z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, dostarcza przekonujących dowodów na reorganizację organelli.

Opis zmian w cytoplazmie starych fenotypowo komórek, manifestujący się pęcznieniem mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego oraz dezintegracją aparatu Golgiego, stanowi trafną charakterystykę fenotypu. Kluczowym merytorycznie spostrzeżeniem jest odnotowanie wzrostu liczby ciałek wielopęcherzykowych (MVBs), co tworzy logiczne przejście do dalszej części pracy poświęconej EVs. Zastosowanie testu aktywności SA- β -gal oraz analizy inkorporacji BrdU pozwoliło na jednoznaczną walidację stanu starzenia. Autorka trafnie dostrzega różnice w intensywności barwienia metabolicznego między etapami I i IV, co wskazuje na postępującą dysfunkcję lizosomów. Interesującym wynikiem jest wyższy odsetek komórek proliferujących w modelu RS (25% BrdU+) w porównaniu do modelu SIPS (5%), co sugeruje większą heterogenność populacji starzejącej się replikacyjnie względem zsynchronizowanej indukcji chemicznej.

W zakresie dynamiki uszkodzeń DNA (DDR), analiza skupisk γ H2AX i 53BP1 dostarcza istotnych danych o kinetyce naprawy. Fakt, że w stadium SIPS IV rośnie liczba

komórek bez uszkodzeń w porównaniu do SIPS I, świadczy o sprawności systemów naprawczych w części populacji, przy jednoczesnym zachowaniu „trwałego” uszkodzenia u pozostałych komórek, co wnosi ważny wkład w zrozumienie trwałości sygnału DDR. Analiza ekspresji genów ścieżek p53/p21 oraz p16/pRB potwierdza klasyczny mechanizm indukcji senescencji, wykazując jednocześnie różną dynamikę markerów: oś p53-p21 dominuje w fazie wczesnej (SIPS I), natomiast sukcesywny wzrost ekspresji CDKN2A (p16) koreluje z utrwaleniem stanu starzenia w stadium SIPS IV i RS. Dane te są spójne z modelem „*p21-p16 switch*”. Dodatkowo, spadek ekspresji laminy B1 (LMNB1) oraz białka HMGB1 we wszystkich modelach stanowi rzetelne potwierdzenie zmian w organizacji chromatyny i otoczki jądrowej. Doktorantka dokonała również istotnej walidacji wyników proteomicznych (MS) za pomocą metody Western blot, wykazując wysoką zbieżność wyników obu technik. Słusznie zauważono przy tym, że dla niektórych markerów (np. HMGB1) zmiany są wyraźniejsze na poziomie białka niż mRNA, co wskazuje na istotną rolę regulacji potranskrypcyjnej lub procesów sekrecji.

Z kolei w tym aspekcie analizy transkryptomu (RNAseq) oraz zastosowanie proteomiki ilościowej (TMT-MS) pozwoliło Doktorantce na konfrontacje otrzymanych wyników RNAseq, co z kolei sugeruje na istotne różnice potranskrypcyjne. W pracy Doktorantka dobrze dobrała także zestaw metod walidacyjnych (Western blot, ELISA, immunocytochemia) dla wyników otrzymanych technikami wysokoprzepustowymi. Zastosowanie mikroskopii elektronowej (TEM) również było trafne ponieważ dostarczyło unikalnych dowodów ultrastrukturalnych, wizualnie potwierdzając dane biochemiczne (np. obecność ciałek wielopęcherzykowych).

Moim zdaniem badania nad proteomem EVs stanowią najbardziej nowatorski fragment rozdziału. Doktorantka wykazała się dużą rzetelnością, stosując wytyczne MISEV (użycie markerów pozytywnych i negatywnych, analiza NTA). Kluczowym i niezwykle ciekawym wynikiem jest wykazanie, że proteom EVs jest bardziej specyficzny dla typu starzenia niż proteom całych komórek, co stanowi nowatorskie spojrzenie w zakresie poszukiwania precyzyjnych biomarkerów.

Należy jednocześnie zaznaczyć, że wykorzystanie analizy NTA pozwoliło udokumentować dwukrotny wzrost sekrecji EVs w stadium SIPS IV, co potwierdza, że intensywność tego procesu narasta wraz z „dojrzewaniem” fenotypu. Czystość frakcji została zweryfikowana zgodnie z wytycznymi MISEV, przy użyciu markerów pozytywnych (CD63, CD81, TSG101) i negatywnych (GM130, TOMM20). Szczegółowa analiza rozkładu wielkości

(co 30 nm) pozwoliła na uchwycenie wzrostu populacji najmniejszych pęcherzyków (30–60 nm). Uzupełnieniem tych badań jest analiza fenotypu sekrecyjnego, gdzie wykazano m.in. 5-krotny wzrost sekrecji IL-6. Różnice w profilu cytokin między modelami SIPS i RS sugerują, że mimo wspólnych markerów, intensywność stanu zapalnego może być odmienna w zależności od czynnika indukującego starzenie.

Z kolei rozdział 4.6, dotyczący autofagii, zasługuje na uznanie krytyczną analizę niejednoznacznych danych. Autorka nie ignoruje rozbieżności między wynikami MS a Western blot dla białka p62, lecz podejmuje próbę ich wyjaśnienia poprzez dodatkowe eksperymenty (immunocytochemia). Wnioskowanie o zahamowaniu *fluxu* autofagicznego na podstawie akumulacji p62 i LC3-II jest logiczne i dobrze uzasadnione literaturą. Dane są zaprezentowane w sposób czytelny i atrakcyjny dla czytelnika: Wykresy Volcano i diagramy Venna idealnie pozwalają na prezentację ogromnej ilości danych ‘omicznych’, mapy ciepła (Heatmaps) pozwalają na szybką identyfikację trendów w ekspresji białek, analiza szlaków REACTOME nadaje wynikom z kolei sens biologiczny, wykraczając poza proste listy genów/białek. Stosowanie odległości Manhattan do wyłaniania kluczowych „genów/białek” jest ciekawym i obiektywnym zabiegiem statystycznym. Dodatkowo ostatni etap pracy oparty na zaawansowanych analizach „omicznych” utrzymuje wysoki standard edytorski. Analiza głównych składowych (PCA) klarownie wizualizuje relacje między modelami, wskazując na odrębność mechanizmu starzenia indukowanego dokсорubicyną od wyczerpania potencjału replikacyjnego. Zastosowane narzędzia statystyczne, w tym diagramy Venna oraz wykresy typu Volcano, dostarczają dużej ilości danych poddanych poprawnej interpretacji. Wyodrębnienie 20 genów o najwyższej zmienności (DEG) pozwala na szybką identyfikację kluczowych regulatorów procesu, co dopełnia obraz przedstawiony w dysertacji.

Do tej części mam kilka pytań wynikających nie z krytyki otrzymanych danych, a zwykłej ciekawości badacza:

- Czym podyktowany był wybór konkretnych punktów czasowych dla etapów SIPS I oraz SIPS IV? Czy dynamika zmian morfologicznych i molekularnych w tych punktach była liniowa, czy też obserwowano gwałtowne „skoki” fenotypowe?
- Choć Doktorantka zauważa różnice między poziomem mRNA a białka (np. dla HMGB1), w tekście brakuje nieco głębszego komentarza na temat możliwych mechanizmów (np. stabilność białka, miRNA, selektywne wydzielanie do EVs).

- Doktorantka wspomina, że poziom p21 w SIPS IV spada poniżej poziomu kontroli (str. 90/92). Jest to intrygujący wynik, często obserwowany w bardzo starych komórkach, gdzie blokada cyklu zostaje przejęta całkowicie przez p16. Warto byłoby w dyskusji odnieść się do tego, czy może to wynikać z degradacji proteasomalnej p21 w późnej fazie starzenia.
- Z czego, zdaniem Doktorantki, wynika znacząca różnica w odsetku komórek proliferujących (inkorporacja BrdU) między modelem RS (25%) a SIPS (5%)? Czy można uznać model SIPS za bardziej homogeny model starzenia do badań molekularnych?
- W opisie ultrastruktury wspomniano o „obrazie chaosu” w cytoplazmie. Czy obserwowana dezintegracja aparatu Golgiego i pęcznienie ER mogą bezpośrednio wpływać na obserwowany profil sekrecji EVs?
- Jaką funkcję biologiczną mogą pełnić opisywane „opalizujące struktury wypełnione aktyną”? Czy mogą być one formą pęcherzyków apoptotycznych lub innych dużych struktur zewnątrzkomórkowych, które nie zostały ujęte w analizie NTA?
- W pracy wykazano mechanizm „p21-p16 switch”. Czy na etapie SIPS IV, gdy dominuje p16, ekspresja p21 całkowicie zanika, czy jedynie stabilizuje się na niższym poziomie? Jakie to ma znaczenie dla trwałości blokady cyklu komórkowego?
- Spadek poziomu HMGB1 w jądrze jest klasycznym markerem starzenia. Czy zaobserwowano pojawienie się tego białka w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (jako elementu SASP)?
- Analiza NTA wykazała wzrost populacji najmniejszych pęcherzyków (30-60 nm) w starzeniu. Czy na podstawie dostępnej literatury lub analiz proteomicznych można przypuszczać, że ta konkretna subpopulacja niesie specyficzny ładunek biologiczny (np. konkretne miRNA lub białka)?
- Wykazano znacząco wyższą sekrecję IL-6 w modelu SIPS w porównaniu do RS. Czy sugeruje to, że starzenie indukowane chemicznie (genotoksyczne) generuje silniejszą odpowiedź zapalną niż starzenie replikacyjne? Jakie mogą być tego konsekwencje *in vivo*?
- Analiza PCA wyraźnie oddzieliła model RS od modeli SIPS. Które grupy genów (według ontologii GO) w największym stopniu determinowały tę separację?

- W przypadku rozbieżności między poziomem mRNA a białka (np. dla HMGB1), jakie mechanizmy potranskrypcyjne lub procesy degradacji białek mogą brać udział w regulacji tych markerów w starzejących się komórkach?
- W aspekcie wyników zaprezentowanych na rycinie 4.47 oraz innych wyników wskazujących na wzrost sekrecji EVs (potwierdzony wcześniej przez NTA) zachodzi przy obniżonym poziomie mRNA Rab27a. Czy możliwe jest, że w komórkach starzejących się dochodzi do przesunięcia pęcherzyków ze szlaku degradacji lizosomalnej (osłabionej, co wykazano w wynikach dot. autofagii) w stronę szlaku sekrecyjnego, nawet bez zwiększania ilości białek efektorowych typu Rab?
- W odniesieniu do wyników zaprezentowanych na rycinie 4.50 zastanawiający jest silny wzrost formy LC3B I po podaniu bafilomycyny we wszystkich grupach. Zazwyczaj spodziewamy się wzrostu głównie formy ufosforylowanej. Może to sugerować, że blokada degradacji wywołuje pętlę sprzężenia zwrotnego nasilającą *de novo* syntezę LC3, co jest mechanizmem obronnym komórki przed nadmiarem niezdegradowanego materiału. Czy brak znaczących różnic w poziomie akumulacji LC3B II między kontrolą a SIPS IV po podaniu Baf A1 sugeruje, że problemem w starzeniu nie jest całkowity brak produkcji autofagosomów, lecz raczej ich przeładowanie lub spowolniona dynamika degradacji.

Rozdział dyskusja zawiera dojrzałą i merytoryczną polemikę z opublikowanymi wcześniej wynikami. Dyskusja wskazuje jednoznacznie, że otrzymane wyniki stanowią wartościowy wkład w zrozumienie biologii starzenia komórkowego, ze szczególnym uwzględnieniem komórek mięśni gładkich aorty. Kluczowym punktem dyskusji jest odejście Doktorantki od postrzegania starzenia jako statycznego punktu końcowego, wykazując, że fenotyp starzeniowy ewoluje w czasie, co prowadzi do wykształcenia odmiennych cech na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego (SIPS) oraz w starzeniu replikacyjnym (RS).

Praca wnosi istotne spostrzeżenia dotyczące struktur SCAFs (ang. *senescent-cell adhesion fragments*). Ich identyfikacja w starzejących się VSMC oraz powiązanie z uwalnianiem wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniami (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) rzuca nowe światło na mechanizmy prozapalne w obrębie blaszki miażdżycowej. Doktorantka trafnie interpretuje również zmiany w organellach, takich jak aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna, łącząc ich powiększenie ze wzmożoną

aktywnością sekrecyjną komórek starych. Wnikliwa analiza klasycznych markerów, takich jak p21 i p16, pozwoliła na potwierdzenie hipotezy o ich czasowej kaskadzie: o ile p21 (kodowane przez *CDKN1A*) dominuje na etapie inicjacji starzenia, o tyle p16 (kodowane przez *CDKN2A*) przejmuje rolę głównego czynnika podtrzymującego blokadę cyklu komórkowego na późniejszych etapach. Jest to spostrzeżenie o dużym znaczeniu diagnostycznym, sugerujące, że dobór biomarkerów musi być ściśle skorelowany z zaawansowaniem procesu senescencji.

Szczególnie silną stroną dyskusji jest konfrontacja własnych wyników transkryptomicznych i proteomicznych z literaturą fachową. Doktorantka rzetelnie analizuje rozbieżności między swoimi danymi a wynikami innych zespołów, wskazując na różnice w modelach komórkowych oraz metodach doboru grup kontrolnych jako źródło zmienności. Wykazanie obecności specyficznych lncRNA, takich jak *PURPL* i *LINC02154*, w grupie genów najsilniej zmieniających się, otwiera nowe możliwości w poszukiwaniu stabilnych markerów starzenia. Z kolei analiza proteomiczna białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) – w tym kolagenów typu I i III – dostarcza bezpośrednich dowodów na aktywną rolę starych VSMC w przebudowie strukturalnej naczyń, co ma krytyczne znaczenie dla stabilności blaszek miażdżycowych i ryzyka ich pęknięcia. Podobnie część dyskusji poświęcona EVs, wpisuje się w najnowocześniejsze trendy badawcze. Doktorantka wykazuje, że EVs wydzielane przez stare komórki niosą specyficzny ładunek białkowy związany z krzepnięciem, odpowiedzią zapalną i organizacją ECM. Porównanie proteomu EVs pochodzących z VSMC z wynikami uzyskanymi z fibroblastów oraz osocza osób starszych pozwala na sformułowanie wniosku o częściowej uniwersalności sygnatury starzeniowej w pęcherzykach, przy jednoczesnym zachowaniu specyfiki tkankowej (np. w przypadku białka HAPLN1). **Całość wyводу jest spójna, logiczna i metodologicznie dojrzała, udowadniając, że głęboka charakterystyka fenotypu sekrecyjnego starych komórek mięśni gładkich jest niezbędna dla zrozumienia patogenezy chorób układu sercowo-naczyniowego związanych z wiekiem.**

Po przeczytaniu Dyskusji nasunęło się mi jednak kilka pytań (z prośbą o ewentualne odniesienie się do nich podczas publicznej obrony):

- Doktorantka sugeruje, że spadek liczby skupisk 53BP1 w późnym starzeniu (SIPS IV) oznacza, że komórki „przypominają komórki kontrolne”. Należy jednak zachować ostrożność w tego typu stwierdzeniach, ponieważ spadek widocznych markerów naprawy nie musi oznaczać naprawienia DNA, lecz może wynikać z wygaszenia ścieżki



DDR lub „ukrycia” uszkodzeń w strukturach chromatyny, które nie są już dostępne dla białek naprawczych.

- Na stronie 159 Doktorantka twierdzi, że SA- β -gal „prawdopodobnie nie odgrywa żadnej roli w starzeniu”. Choć enzym ten nie jest przyczyną starzenia, nowsze badania sugerują, że zwiększona aktywność lizosomalna (której markerem jest ten enzym) jest kluczowa dla przetrwania komórki w stanie senescencji (autofagia, metabolizm). Stwierdzenie, że nie odgrywa „żadnej roli”, może być uznane za zbyt kategoryczne.
- Wykazano, że populacja RS jest bardziej heterogenna pod względem wbudowywania BrdU niż komórki po doksorubicynie. Czy ta heterogenność wpływa na wyniki proteomiczne całych populacji? Czy nie zacierają one różnic między „prawdziwie” starymi komórkami a tymi, które po prostu wolniej dzielą się w populacji RS?
- Skoro ekspresja genu *CDKN1A* (p21) jest wysoka, a poziom białka p21 spada w fazie SIPS IV, jakie mechanizmy posttranskrypcyjne lub degradacji białka bierze Doktorantka pod uwagę? Czy może to wynikać z aktywności proteasomów, która zmienia się w czasie starzenia?
- Doktorantka wspomina o znaczeniu SCAFs w kontekście miażdżycy. Czy w badanych próbkach (lub dostępnych danych *in vivo*) zaobserwowano korelację między ilością tych fragmentów a stopniem niestabilności blaszki? Jak SCAFs mają się do procesów zwapnienia naczyń?
- SIPS indukowano doksorubicyną. Jest to lek chemioterapeutyczny o specyficznym mechanizmie działania (interkalacja, inhibicja topoisomerazy II). Na ile zaobserwowane zmiany w proteomie są uniwersalne dla starzenia, a na ile są specyficzną odpowiedzią na ten konkretny stresogen w porównaniu np. do starzenia indukowanego nadtlaniem wodoru?
- W tekście zauważono, że poziom kolagenów (*COL1A1*, *COL1A2*) rośnie w SIPS I, a spada w SIPS IV. Jak to się ma do stabilności blaszki miażdżycowej? Czy faza SIPS IV (późna) jest fazą, w której stare komórki VSMC stają się najbardziej niebezpieczne (sprzyjają pękaniu blaszki przez spadek syntezy kolagenu)?

Niezależnie od moich licznych pytań chciałbym raz jeszcze podkreślić, że **przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest w mojej ocenie bardzo cennym merytorycznie opracowaniem naukowym**. Doktorantka przekonująco argumentuje, że akumulacja starych komórek VSMC w czapeczce włóknistej prowadzi do nieefektywnej naprawy tkanki, co w

konsekwencji drastycznie zwiększa ryzyko pęknięcia blaszki, a tym samym wystąpienia udaru lub zawału serca. Oceniana praca posiada również potencjał aplikacyjny. Identyfikacja specyficznych markerów białkowych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych otwiera obiecujące perspektywy w diagnostyce nieinwazyjnej, mogąc służyć do oceny zaawansowania procesów starzenia naczyń na podstawie rutynowej analizy krwi.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej **w pełni spełnia warunki** określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742).

Stwierdzam, także, iż:

1. Sposób ujęcia tematu, rzetelny przegląd literatury oraz precyzyjne osadzenie wyników w kontekście współczesnej nauki dowodzą, że Doktorantka posiada pogłębioną i ugruntowaną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała się biegłością w posługiwaniu się językiem naukowym oraz doskonałym zrozumieniem złożonych procesów biologicznych stanowiących przedmiot badań.
2. Mgr Alicja Targońska dowiodła, że potrafi samodzielnie planować i realizować zaawansowane procesy badawcze. Świadczy o tym poprawnie sformułowana hipoteza, dobór adekwatnych, nowoczesnych metod eksperymentalnych, a także umiejętność krytycznej interpretacji uzyskanych danych i wyciągania wyważonych wniosków.
3. Oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, wnosząc istotny wkład w rozwój dyscypliny. Wysoki potencjał aplikacyjny i komercyjny przedstawionych rezultatów stanowi o unikatowości rozprawy na tle dotychczasowego stanu wiedzy.

Mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że praca doktorska istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Alicji Targońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, ze względu na wyjątkową wartość naukową oraz nowatorski charakter wyników o wysokim potencjale wdrożeniowym, z pełnym przekonaniem **wnoszę do Rady Naukowej o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.**

Rzeszów, 19/04/2026

prof. dr hab.  Maciej Wnuk

Kraków, 30 kwietnia 2026



**JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKOW**

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alicji Targońskiej, p.t. „Starzenie komórek mięśni gładkich aorty - związek między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych”

Praca doktorska wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia oraz w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem dr hab. Grażyny Mosieniak, prof. IBD

Faculty of Biochemistry,
Biophysics and
Biotechnology

Department of Cell
Biology

Prof. Jarosław Czyż

Na poziomie komórkowym homeostaza tkanek, organów i organizmów wielokomórkowych jest wypadkową wielu procesów, które można zaliczyć do dwóch podstawowych klas: szybkich i krótkotrwałych reakcji adaptacyjnych i reakcji długotrwałych, niosących długofalowe skutki dla fenotypu komórek, względnie losu całych zespołów komórkowych. Wpływać one mogą na równowagę między proliferacją komórek, ich fenotypowym różnicowaniem oraz mniej lub bardziej selektywną (auto)eliminacją, co przekłada się na homeostazę tkanek. Eliminację komórek zwykle poprzedza ich starzenie lub/i senescencja, które objawiają się trwałym/nieodwracalnym zahamowaniem proliferacji komórek oraz ich głęboką przebudową morfologiczną, metaboliczną i funkcjonalną. Akumulacja starzejących się komórek w tkankach przyczynia się do „naturalnego” starzenia się organizmu, ale też do rozwoju chorób związanych z wiekiem. Jedną z nich jest miażdżycza, której rozwojowi sprzyja m.in. starzenie się komórek mięśni gładkich naczyń (ang. VSMCs). Proces ten prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej, m.in. poprzez zwiększoną aktywność sekrecyjną komórek podlegającym programom fenotypowym zw. ze starzeniem (m.in. Senescence Associated Secretory Phenotype; SASP). Jednym ze zjawisk wielowymiarowo sprzężonych ze starzeniem komórek jest autofagia (eliminacja uszkodzonych organelli lub białek). W zależności od kontekstu może ona wspierać proces starzenia komórek (m.in. poprzez wspieranie SASP), jak i go hamować (poprzez regenerację struktur sub-komórkowych). Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była identyfikacja zmian zachodzących w komórkach mięśni gładkich naczyń (VSMCs) na różnych etapach starzenia indukowanego stresem oraz starzenia „replikacyjnego”. W szczególności praca koncentruje się na związkach między starzeniem komórkowym, autofagią i sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. extracellular vesicles, EVs) w kontekście potencjalnego zaangażowania tych procesów w rozwój miażdżycy. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w kierunek badań kluczowy dla rozwoju metod leczenia miażdżycy, dlatego jej tematykę należy uznać za aktualną, podążającą za dominującymi obecnie trendami badawczymi.

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 6146

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

Praca doktorska mgr Alicji Targońskiej ma charakter typowy dla tego typu monografii: składają się na nią: tabele skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim, które w przystępny sposób kompilują uzyskane wyniki i podstawowe wnioski z nich płynące, Wstęp, opis Celów pracy, Metod i Wyników, oraz ich Dyskusja, szczegółowe podsumowanie i zestawienie Wniosków płynących z pracy, wreszcie wykaz Literatury. Objętościowo jest ona dość obszerna, gdyż liczy 202 strony, zawiera 58 rycin oraz kilkanaście tabel. Bibliografia liczy >300 pozycji, w tym zawiera publikacje, które uznać można za klasyczne, jak i nowsze prace dotyczące tematyki rozprawy. Strona redakcyjna rozprawy nie wzbudza większych zastrzeżeń: praca przygotowana jest starannie, ryciny są czytelne i wyraźne, a błędy literowe i językowe, których pewna liczba wkradła się do tekstu pracy, nie wpływają na jednoznacznie pozytywny jego odbiór.

Tło tematyczne badań stanowiących podstawę rozprawy zostało zarysowane w jej 31-stronnicowym Wstępie. Autorka wprowadza w nim czytelnika w podstawowe

zagadnienia dotyczące starzenia komórkowego, jak i kwestie potencjalnie kluczowe dla rozwoju nowych strategii leczenia miażdżycy. W szczególności skoncentrowała się ona na niuansach związanych z rozróżnieniem między starzeniem replikacyjnym (RS) i starzeniem przyspieszonym indukowanym stresem (SIPS), omówiła kolejno markery starzenia, fenotyp sekrecyjny komórek związany z SASP i mechanizmy wzmożonej produkcji czynników charakterystycznych dla tego fenotypu. Następnie przeszła do opisu fenotypu i funkcji komórek mięśni gładkich naczyń (VSMCs), wbudowując go w opis roli tych komórek w rozwoju blaszki miażdżycowej i aktualnego stanu wiedzy na temat powstawania i budowy blaszki, roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) w tym procesie, fenotypowej plastyczności VSMC i roli starzenia komórkowego w regulacji stabilności blaszki miażdżycowej. Wreszcie Autorka przeszła do klasyfikacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ich biogenezy i wydzielania jako elementu fenotypu sekrecyjnego VSMCs. Całość puentuje ona opisem roli autofagii w utrzymywaniu żywotności tych komórek i ich aktywności sekrecyjnej (w tym sekrecji EVs) jako czynnika wpływającego na lokalną homeostazę tkanek. W połączeniu z opisem roli statyn w starzeniu komórkowym i leczeniu miażdżycy dobór tematyki i rozłożenie akcentów tego rozdziału sugeruje, że Autorka swobodnie porusza się w tematyce związanej z rozprawą. Tę część rozprawy czyta się dobrze, co wynika na równi z jej ilustratywnego języka i rycin wplecionych w jej strukturę, a jej treść potwierdza pogłębioną wiedzę Kandydatki w zakresie przedmiotu rozprawy.

Za główne cele doświadczeń wykonanych w ramach rozprawy uznano charakterystykę fenotypową komórek VSMC ulegających (i) starzeniu replikacyjnemu oraz (ii) starzeniu indukowanemu stresem wywołanym „pulsowym” podaniem doksorubicyny. W dalszej kolejności Autorka postanowiła prześledzić (iii) udział autofagii w progresji tego procesu, w tym (iv) w regulacji wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) przez komórki VSMC. Jako środki do tego celu Autorka wytypowała porównanie zmian fenotypowych komórek poddanych różnym modelom starzenia w oparciu o: (i) analizę poprzednio zdefiniowanych biomarkerów tego procesu, (ii) charakterystykę transkryptomu komórek VSMC ulegających starzeniu indukowanemu oraz replikacyjnemu, (iii) analizy proteomu tych komórek oraz (iv) fenotypizację wydzielanych przez VSMC pęcherzyków i określenie roli autofagii w ich generowaniu i determinowaniu ich właściwości. Wprawdzie zabrakło w tym miejscu jasno wyartykułowanej hipotezy badawczej, jednak same cele są jasno sprecyzowane i w pełni uzasadnione treścią Wstępu rozprawy.

Metodyka badań jest mocną stroną pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Targońskiej. Dobór i spektrum wykorzystanych w badaniach technik doświadczalnych, których uszczegółowiony opis został zawarty w rozdziale Materiały i Metody, obrazuje bogaty warsztat badawczy Doktorantki i umiejętność wykorzystania komplementarnych podejść badawczych. Do analiz zmian w zachowaniu komórek VSMC w trakcie ich starzenia wykorzystano m.in. immunofluorescencyjne analizy przebiegu cyklu komórkowego (wbudowywanie BrdU do DNA), testy cytofluorymetryczne, analizy ELISA, znakowanie fluorescencyjne (w tym uszkodzeń DNA i lizosomów) oraz mikroskopię elektronową (dodatkowo wzbogaconą o technikę „immunogold”). Techniki te połączone z analizami poziomów białek z wykorzystaniem techniki immunoblot, a kluczowym elementem całości rozprawy były analizy „omiczne” (zarówno samych komórek, jak i wydzielanych przez nie EVs). Na tyle, na ile byłam w stanie to ocenić, opis metodyki jest kompletny i szczegółowy. Stwarza on możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń przez osobę dysponującą odpowiednim sprzętem i wiedzą. Pojawia się w nim nieco wyrażen slangowych i skrótów myślowych (np.: „komórki na wczesnych pasażach”; ponadto nie jestem pewien, czy analizy poziomów cytokin w medium z wykorzystaniem cytometru przepływowego można zaliczyć do technik *stricte* „cytometrycznych”). Z obowiązku recenzenta chciałbym też w tym miejscu poprosić o doprecyzowanie zakresu jej udziału w uzyskaniu i analizach

opisanych w pracy wyników badań wielkoskalowych i mikroskopowych. Jednak niezależnie od tych uwag użycie urozmaiconych i wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy też o warsztacie badawczym Autorki rozprawy. Treść tego rozdziału pokazuje istotny i samodzielny wkład Autorki w badania, jej dobre przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także świadczy o jej umiejętności odpowiedniego wykorzystania zasad i metod poznawczych.

W pierwszym etapie przeprowadzonych w ramach rozprawy badań wykonano wszechstronne analizy zmian fenotypu komórek VSMC towarzyszących ich starzeniu. Oparte one zostały o badania klasycznych markerów tego procesu, a następnie uzupełnione o analizy transkryptomyczne i proteomiczne. Wykazały lub potwierdziły one szereg różnic i podobieństw między starzeniem indukowanym i replikacyjnym, które do pewnego stopnia zależały od etapu zaawansowania tego procesu. Potwierdziły też przydatność białek jądrowych jako markerów wczesnych i późnych etapów obu typów starzenia, a także wykazały zmiany poziomów ekspresji genów kodujących białka związane z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, przy spadku ekspresji wielu innych genów, w tym zaangażowanych w regulację proliferacji i naprawę DNA. Na uwagę zasługują wyniki wskazujące na ograniczoną wiarygodność niektórych powszechnie stosowanych markerów starzenia komórkowego (np. p16, p21 i p53). Co więcej, analizy proteomu komórek VSMC ujawniły dynamizację jego zmian oraz ich częściową konwergencję na późnych etapach zarówno starzenia replikacyjnego, jak i indukowanego. Wykazały one też różnice względem komórek proliferujących i będących na wczesnym etapie starzenia indukowanego stresem. Stwierdzono wreszcie zmiany sugerujące przeprogramowanie metaboliczne komórek VSMC i ewolucję ich wpływu na funkcje komórek układu odpornościowego. Dane te stanowią istotny wkład w naszą wiedzę na temat natury, heterogenności i specyficzności komórkowej procesów leżących u podstaw starzenia komórkowego. Dały one również asumpt do bardziej pogłębionych analiz związków między starzeniem a sekrecyjnym fenotypem komórek VSMC.

Analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki VSMC wykazały wzrost wydajności ich tworzenia wraz z progresją procesu starzenia komórek. Wraz z tym procesem, proteom EVs wydzielanych przez komórki stare ulega też większej dywersyfikacji, co wskazuje na jego przebudowę lub/i dywersyfikację fenotypową populacji starzejących się komórek. Jednak zmiany obserwowane w proteomie pęcherzyków w znacznym stopniu odzwierciedlają zmiany w proteomie komórek. W kontekście aplikacyjnym może to ułatwić wytypowanie markerów do oceny postępu dysfunkcji układu krążenia w oparciu o analizę EVs obecnych w krwi. Na poziomie mechanistycznym zależność między spadkiem wydajności autofagii i postępującą akumulacją pęcherzyków w starzejących się komórkach potwierdza związki między tymi procesami, choć wyniki doświadczeń z wykorzystaniem inhibitorów autofagii (bafilomycyny A1 i chlorochiny) i simwastatyny wskazują na złożoność tych mechanizmów. Nieco szkoda, że Autorka nie rozwinęła tego tematu w oparciu o analizy mechanistyki obserwowanych korelacji. Brak wpływu tego ostatniego związku można tłumaczyć brakiem zaangażowania cholesterolu lub/i prenylacji białek w indukcję wydzielania EVs, jednak nasuwa się pytanie jaki mechanizm odpowiada za słabiej zaznaczoną indukcję wydzielania EVs w badanych komórkach po podaniu chlorochiny. Ponieważ związek ten musi się dostać do lizosomów, być może zaburzenie tego procesu odpowiada za tę obserwację? Pytania te nie kwestionują jednak dużego ładunku informacyjnego niesionego przez tę część rozprawy.

Podsumowując, rozprawa systematyzuje zmiany transkryptomu, proteomu i sekretomu towarzyszące różnym rodzajom starzenia komórek VSMCs i wspomagające ich akumulację w ścianach naczyń, a także rozwój i niestabilność blaszek miażdżycowych. Koincydencja tych zmian z upośledzoną autofagią wskazuje na

związki między oboma procesami, ich potencjalne powiązania z fenotypem sekrecyjnym (w tym wydzielaniem EVs) i ich konsekwencje dla rozwoju miażdżycy. Białka, które są nadreprezentowane w EVs wydzielanych przez stare komórki VSMC mogą rzeczywiście być potencjalnymi biomarkerami rozwoju miażdżycy. Dlatego wyniki uzyskane w rozprawie przyczynić się mogą do lepszego zrozumienia zmian zachodzących w trakcie starzenia komórek VSMC i identyfikacji markerów starzenia do diagnostyki oraz oceny efektów leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego. Wątki te znalazły odzwierciedlenie w liczącej 18 stron Dyskusji. Autorka przeanalizowała swoje wyniki w oparciu o dane literaturowe. Treść tego rozdziału potwierdza jej pogłębioną wiedzę w zakresie przedmiotu rozprawy, umiejętność krytycznego podejścia do uzyskanych wyników, a także jej samodzielność intelektualną. Z drugiej strony po lekturze tej części rozprawy nasunęło mi się kilka pytań. Na przykład:

- co oznaczać może wzrost wbudowywania BrdU w „późnych” etapach starzenia VSMCs (Ryc. 4.4D)? Czy nie jest to oznaka odbudowy potencjału proliferacyjnego części komórek?
- na ile EVs mogą być pokłosiem „zdarzeń apoptotycznych”, które najpewniej towarzyszyły propagacji starzejących się populacji komórek VSMC?
- czy w badanym modelu jest miejsce na poli(morfo)nuklearne/poliploidalne komórki gigantyczne?

Pytania te nie umniejszają wagi uzyskanych wyników i ogólnie bardzo dobrej oceny rozprawy. Rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej stanowi spójne opracowanie o dużym walorze poznawczym. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę przyczyniają się do lepszego zrozumienia podłoża zmienności poziomów białek uważanych za markery procesu starzenia komórek mięśni gładkich naczyń, jak i mediatorów kształtujących powiązania między tym procesem a miażdżycą, w szczególności mikropęcherzyków. **Wkład Doktorantki w część doświadczalną stanowiącą podstawę przedłożonej do recenzji rozprawy był kluczowy dla jej powstania, sama rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a jej treść potwierdza pogłębioną wiedzę Kandydatki w zakresie przedmiotu.** Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Alicji Targońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie biorąc pod uwagę rozmach i szeroki wachlarz technik wykorzystanych w rozprawie, wagę uzyskanych wyników, a także poważny dorobek naukowy kandydatki, wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

(Jarosław Czyż)



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY



ZAKŁAD BIOCHEMII I ŻYWIENIA

Warszawa, 29 kwietnia 2026 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Starzenie komórek mięśni gładkich aorty – związek między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych”

autorstwa mgr Alicji Targońskiej

Praca doktorska mgr Alicji Targońskiej pt. „Starzenie komórek mięśni gładkich aorty – związek między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych” została wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia oraz w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem dr hab. Grażyny Mosieniak, prof. Instytutu. Badania opisane w rozprawie zostały zrealizowane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS pt. „Rola autofagii w regulacji wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz białek przez komórki mięśni gładkich naczyń na różnych etapach procesu starzenia”, w którym Doktorantka pełniła rolę wykonawcy.

Ocena wyboru tematu pracy

Przedstawiona rozprawa podejmuje bardzo aktualny i ważny problem biologii komórki, biologii starzenia oraz patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego. Starzenie komórkowe jest obecnie postrzegane nie tylko jako mechanizm ograniczający proliferację komórek uszkodzonych, lecz także jako proces aktywnie uczestniczący w przebudowie mikrośrodowiska tkankowego. Szczególne znaczenie ma w tym kontekście fenotyp sekrecyjny komórek starych, obejmujący zarówno rozpuszczalne mediatory zapalne, czynniki wzrostu i enzymy modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową, jak i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

Wybór komórek mięśni gładkich aorty (VSMC) jako modelu badawczego jest bardzo dobrze uzasadniony. Komórki VSMC odgrywają istotną rolę w przebudowie ściany naczynia i rozwoju

blaszki miażdżycowej. Ich starzenie może przyczyniać się do progresji zmian miażdżycowych, destabilizacji blaszki, nasilenia stanu zapalnego oraz zaburzenia procesów naprawczych. Z tego względu lepsze poznanie zmian zachodzących w starzejących się komórkach VSMC ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale również potencjalnie translacyjne.

Za szczególnie wartościowe uważam skoncentrowanie pracy na zależności między autofagią a wydzielaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Autofagia jest procesem o złożonej roli w starzeniu: może chronić komórkę przed akumulacją uszkodzonych organelli i białek, ale w określonych warunkach może również wspierać utrzymywanie fenotypu komórek starych. Jednocześnie coraz więcej danych wskazuje, że układ endosomalno-lizosomalny, autofagia i sekrecja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są ze sobą funkcjonalnie powiązane. Podjęcie próby uporządkowania tych zależności w modelu starzenia VSMC należy uznać za bardzo trafny wybór tematu pracy doktorskiej.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę klasycznej monografii napisanej w języku polskim. Liczy 202 strony i została podzielona na typowe dla tego typu dysertacji rozdziały: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski, bibliografię oraz spis publikacji Autorki rozprawy. Spis literatury obejmuje ponad 310 pozycji bibliograficznych, w przeważającej części prac z ostatnich kilku lat, co świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w aktualnym stanie wiedzy.

Struktura pracy jest przejrzysta i logiczna. Wstęp teoretyczny jest obszerny, ale dobrze powiązany z problematyką rozprawy. Doktorantka omawia kolejno starzenie komórkowe, markery starzenia, fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, rolę komórek VSMC w rozwoju blaszki miażdżycowej, biogenezę i znaczenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, autofagię oraz rolę statyn w starzeniu komórkowym. Taki układ pozwala czytelnikowi zrozumieć zarówno biologiczne tło pracy, jak i logikę zaplanowanych doświadczeń.

Rozdział Materiały i metody został przygotowany szczegółowo. Doktorantka opisała wykorzystane modele komórkowe, warunki indukcji starzenia, metody oceny autofagii, techniki Western blot, barwienia cytochemiczne i immunocytochemiczne, mikroskopię elektronową, oznaczanie cytokin, izolację i charakterystykę pęcherzyków

zwnętrzkomórkowych, sekwencjonowanie RNA, proteomikę z wykorzystaniem znakowania TMTpro oraz analizę bioinformatyczną i statystyczną. Zakres metod jest szeroki i nowoczesny, a ich dobór odpowiada złożoności postawionych pytań badawczych.

Rozprawa jest bogato ilustrowana. Ryciny ułatwiają śledzenie wyników i dobrze dokumentują przeprowadzone analizy. Szczególnie istotne są zestawienia wyników transkryptomicznych i proteomicznych oraz ryciny przedstawiające charakterystykę pęcherzyków zwnętrzkomórkowych i parametry autofagii. Praca została przygotowana starannie, a język rozprawy jest zasadniczo poprawny i komunikatywny.

Ocena merytoryczna

Cele pracy zostały sformułowane jasno. Głównym zamierzeniem Doktorantki była charakterystyka komórek VSMC ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz starzeniu indukowanemu stresem na wczesnym i późnym etapie, jak również analiza wydzielanych przez nie pęcherzyków zwnętrzkomórkowych. Drugim zasadniczym celem było zbadanie udziału autofagii w regulacji wydzielania pęcherzyków zwnętrzkomórkowych przez młode i stare komórki VSMC.

Na szczególne podkreślenie zasługuje rozróżnienie różnych etapów starzenia. Doktorantka nie traktuje starzenia komórkowego jako jednorodnego stanu końcowego, lecz jako dynamiczny proces, w którym fenotyp komórek zmienia się w czasie. Jest to podejście bardzo wartościowe, ponieważ umożliwia uchwycenie różnic między wczesnym i późnym etapem starzenia indukowanego stresem oraz porównanie ich ze starzeniem replikacyjnym. W mojej ocenie jest to jeden z najmocniejszych elementów koncepcyjnych rozprawy.

Pierwsza część wyników obejmuje klasyczną charakterystykę fenotypu starzenia komórek VSMC. Doktorantka wykazała zmiany morfologiczne, zahamowanie proliferacji, zwiększoną aktywność SA- β -galaktozydazy, zmiany markerów uszkodzeń DNA oraz zmiany ekspresji białek związanych z regulacją cyklu komórkowego. Analiza ta stanowi solidną podstawę dla dalszych badań, ponieważ potwierdza, że wykorzystane modele rzeczywiście odzwierciedlają proces starzenia komórkowego.

Bardzo ważnym elementem rozprawy są analizy transkryptomiczne. Umożliwiły one Doktorantce pokazanie, że starzeniu komórek VSMC towarzyszy globalna przebudowa ekspresji genów, obejmująca zwłaszcza geny związane z proliferacją, naprawą DNA,

odpowiedzią zapalną i przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki te dobrze wpisują się w obecne rozumienie starzenia jako procesu obejmującego zarówno utratę zdolności proliferacyjnych, jak i aktywną zmianę funkcji sekrecyjnych oraz oddziaływania komórek z mikrośrodowiskiem.

Kolejną mocną stroną pracy jest analiza proteomu komórek VSMC oraz proteomu wydzielanych przez nie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Doktorantka wykazała, że liczba białek istotnie zmieniających się w starzejących się komórkach wzrasta wraz z zaawansowaniem procesu starzenia. Wśród tych białek nadreprezentowane były grupy związane z metabolizmem, odpowiedzią immunologiczną, przebudową cytoszkieletu i macierzy zewnątrzkomórkowej. Szczególnie interesujące jest porównanie proteomu komórkowego z proteomem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które pozwoliło na wytypowanie pięciu potencjalnych markerów starzenia obecnych w pęcherzykach (kaweolina 1, serpina B2, czynnik krzepnięcia III, białko szoku cieplnego HSPB7 oraz deaminaza AMP). Wybór ten jest dobrze uzasadniony - niektóre z wymienionych białek odgrywają znaną rolę w rozwoju miażdżycy, co dodatkowo zwiększa znaczenie tego wyniku. Ten fragment pracy ma istotny potencjał translacyjny, ponieważ pęcherzyki zewnątrzkomórkowe krążące we krwi mogłyby w przyszłości stanowić źródło biomarkerów procesów starzenia zachodzących w ścianie naczynia.

Najważniejszy wątek rozprawy dotyczy związku między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Doktorantka wykazała, że zarówno starzenie replikacyjne, jak i indukowane stresem wiążą się ze spadkiem wydajności autofagii. Jednocześnie w komórkach starych obserwowano akumulację struktur związanych z układem autofagiczno-lizosomalnym oraz zwiększone wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Farmakologiczne zahamowanie autofagii bafilomycyną A1 prowadziło do nasilenia sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych szczególnie w komórkach znajdujących się na późnych etapach starzenia. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawione w rozprawie wyniki jako pierwsze wskazują na powiązanie mechanizmu autofagii sekrecyjnej indukowanej zaburzeniem funkcji lizosomów (SALI, secretory autophagy during lysosome inhibition) z fenotypem sekrecyjnym komórek na późnych etapach starzenia. Stanowi to oryginalny wkład pojęciowy w rozumienie biologii starzejących się komórek mięśni gładkich naczyń.

Wartościowym uzupełnieniem pracy jest analiza wpływu simwastatyny na sekretom starzejących się komórek VSMC. Doktorantka wykazała, że simwastatyna zmniejsza

wydzielanie wybranych rozpuszczalnych czynników SASP, nie wpływając jednocześnie na poziom wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Wynik ten jest interesujący z punktu widzenia biologii działania statyn, ponieważ sugeruje, że modulacja różnych komponentów sekretomu komórek starych może zachodzić w odmiennych mechanizmach. Ten fragment rozprawy ma charakter bardziej eksploracyjny, ale dobrze poszerza główną narrację pracy.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały poddane rzeczowej dyskusji. Doktorantka dobrze porusza się w literaturze dotyczącej starzenia komórkowego, fenotypu SASP, autofagii, układu endosomalno-lizosomalnego i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dyskusja pokazuje umiejętność łączenia wyników własnych z aktualnym stanem wiedzy, a także zdolność do ostrożnego formułowania wniosków. Autorka nie ogranicza się do prostego podsumowania wyników, lecz próbuje wskazać ich znaczenie biologiczne i potencjalne implikacje dla patogenezy chorób naczyniowych.

Ocena rozprawy w świetle art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce

Zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie albo dyscyplinach, wykazywać umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W odniesieniu do rozprawy mgr Alicji Targońskiej wszystkie te warunki zostały spełnione.

Po pierwsze, rozprawa prezentuje bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie biologii komórki, biologii starzenia, autofagii, sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego. Świadczy o tym zarówno obszerny, logicznie skonstruowany wstęp, jak i sposób prowadzenia dyskusji, w której Doktorantka swobodnie odwołuje się do aktualnej literatury i trafnie umieszcza wyniki własne w szerszym kontekście biologicznym.

Po drugie, rozprawa wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka zaplanowała i zrealizowała złożony projekt badawczy, obejmujący kilka komplementarnych modeli starzenia komórkowego i szeroki wachlarz metod eksperymentalnych. Umiejętnie połączyła klasyczne techniki biologii komórki z analizami



wysokoprzepustowymi, a następnie dokonała integracji wyników fenotypowych, transkryptomicznych, proteomicznych i funkcjonalnych. Zakres przeprowadzonych badań, poprawność interpretacji wyników oraz umiejętność wskazania ograniczeń modelu świadczą o dojrzałości naukowej Autorki.

Dodatkowym potwierdzeniem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej jest dorobek publikacyjny Doktorantki. Z wykazu zawartego w rozprawie wynika, że jest ona współautorką dziewięciu prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, w tym ośmiu w czasopismach międzynarodowych, m. in. „International Journal of Molecular Sciences”, „Analytical Chemistry”, „European Journal of Pharmaceutical Sciences”, „Aging”, „STAR Protocols”, „Life”, „Nanotechnology Science and Applications” oraz „International Journal of Nanomedicine”. Znaczna część tych publikacji tematycznie koresponduje z problematyką rozprawy, w szczególności w zakresie izolacji, charakterystyki i biologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co świadczy o systematycznym pogłębianiu warsztatu badawczego w obszarze będącym przedmiotem dysertacji.

Po trzecie, rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Oryginalność pracy polega przede wszystkim na wykazaniu związku między zaburzeniami autofagii a nasilonym wydzielaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez starzejące się komórki mięśni gładkich naczyń, z uwzględnieniem różnych etapów starzenia i porównania starzenia indukowanego stresem ze starzeniem replikacyjnym. Wyniki Doktorantki po raz pierwszy wskazują, że mechanizm autofagii sekrecyjnej typu SALI może uczestniczyć w kształtowaniu sekretomu komórek na późnych etapach starzenia. Dodatkową wartością pracy jest wskazanie konkretnych potencjalnych markerów starzenia obecnych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz pokazanie, że poszczególne komponenty sekretomu komórek starych mogą być różnie modulowane, czego przykładem są wyniki uzyskane dla simwastatyny.

Uwagi krytyczne i pytania do Doktorantki

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i uwag. Mają one charakter dyskusyjny i nie podważają wysokiej wartości merytorycznej pracy.

1. W pracy wykorzystano bafilomycynę A1 i chlorochinę jako inhibitory procesu autofagii. Są to narzędzia powszechnie stosowane, ale ich działanie wykracza poza

autofagię i obejmuje cały układ endosomalno-lizosomalny. Ponieważ biogeneza i uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych również zależą od tego układu, interpretacja wyników wymaga ostrożności. Czy Doktorantka rozważała wykorzystanie dodatkowych metod, na przykład wyciszenia wybranych genów autofagii, aby potwierdzić obserwowany związek między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych?

2. Na podstawie obrazu ciałek wielopęcherzykowych w mikroskopii elektronowej Doktorantka sugeruje, że w populacji pęcherzyków wydzielanych przez komórki na późnym etapie starzenia rośnie udział egzosomów. Czy planowana jest weryfikacja tego wniosku z wykorzystaniem bardziej szczegółowej frakcjonacji pęcherzyków oraz analizy markerów tetraspanin (CD9, CD63, CD81) w wyizolowanych frakcjach?
3. Jednym z bardzo interesujących wyników pracy jest wytypowanie białek pęcherzykowych, które mogłyby pełnić funkcję markerów starzenia komórek VSMC. Czy zdaniem Doktorantki wskazane markery (kaweolina 1, serpina B2, czynnik krzepnięcia III, HSPB7, deaminaza AMP) mają charakter specyficzny dla starzenia VSMC, czy raczej mogą być ogólnymi markerami starzenia różnych typów komórek? To pytanie ma szczególne znaczenie w kontekście potencjalnego wykorzystania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych we krwi jako narzędzia diagnostycznego.
4. W pracy wykazano współwystępowanie zaburzeń autofagii i wzmożonej sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórkach starych oraz wzrost sekrecji po podaniu bafilomycyny A1. Czy zdaniem Doktorantki zaburzenie autofagii jest przyczyną wzmożonej sekrecji pęcherzyków, czy też oba zjawiska są równoległymi skutkami procesu starzenia?
5. Wyniki rozprawy uzyskano w modelu komórkowym in vitro, podczas gdy środowisko blaszki miażdżycowej jest znacznie bardziej złożone i obejmuje oddziaływania VSMC z komórkami śródbłonna, makrofagami, limfocytami, lipidami i zmienioną macierzą zewnątrzkomórkową. Czy Doktorantka uważa, że uzyskane wyniki można byłoby w kolejnym etapie zweryfikować w modelach kokultury lub w materiale pochodzącym z blaszek miażdżycowych?

6. Bardzo ciekawy jest wynik pokazujący, że simwastatyna ogranicza wydzielanie rozpuszczalnych czynników SASP, ale nie wpływa na poziom wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Czy Doktorantka interpretuje ten wynik jako dowód na częściową niezależność regulacji rozpuszczalnych i pęcherzykowych komponentów SASP? Czy badano, jak simwastatyna wpływa na skład białkowy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, nawet jeśli nie zmienia ich liczby?
7. Do indukcji starzenia wykorzystano doksorubicynę, czyli czynnik powodujący uszkodzenia DNA i silny stres komórkowy. Jest to model uzasadniony i szeroko stosowany, ale starzenie VSMC w przebiegu miażdżycy może być indukowane także przez utleniony LDL, cytokiny zapalne czy zaburzenia mechaniczne. Czy Doktorantka przewiduje, że związek między zaburzeniami autofagii a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych byłby podobny w innych modelach indukcji starzenia, na przykład w modelu z utlenionym LDL, bliższym warunkom *in vivo* w blaszce miażdżycowej?
8. Analizy transkryptomiczne i proteomiczne są bardzo cenną częścią pracy, ale dostarczają dużej liczby kandydatów do dalszej walidacji. Które spośród zidentyfikowanych białek lub ścieżek Doktorantka uważa za najważniejsze do kontynuacji badań funkcjonalnych?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej jest bardzo wartościowym opracowaniem oryginalnego problemu badawczego. Doktorantka podjęła aktualny i ważny temat dotyczący biologii starzenia komórek mięśni gładkich aorty oraz związku między autofagią a sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Praca wyróżnia się szerokim zakresem eksperymentalnym, zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych oraz umiejętną integracją danych uzyskanych na poziomie fenotypowym, transkryptomicznym, proteomicznym i funkcjonalnym.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam kompleksową charakterystykę starzenia komórek VSMC w modelu starzenia indukowanego stresem i replikacyjnego, wykazanie dynamicznych zmian zależnych od etapu starzenia, opisanie przebudowy proteomu



komórkowego i pęcherzykowego, wytypowanie konkretnych białek-kandydatów na biomarkery starzenia obecnych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz wykazanie funkcjonalnego związku między zaburzeniami autofagii a nasilonym wydzielaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki stare. Na szczególne wyróżnienie zasługuje oryginalny wkład pojęciowy pracy, polegający na powiązaniu mechanizmu autofagii sekrecyjnej typu SALI z fenotypem sekrecyjnym komórek na późnych etapach starzenia – w mojej ocenie jest to istotne odkrycie, które wnosi nowe dane do biologii starzejących się komórek mięśni gładkich naczyń.

Przedstawione przeze mnie uwagi mają charakter uzupełniający i dotyczą przede wszystkim możliwych kierunków dalszych badań. Nie umniejszają one wartości rozprawy, która została przygotowana starannie, z dużą dojrzałością naukową i z wykorzystaniem właściwie dobranej metodyki.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Alicji Targońskiej spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, wykazuje jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Alicji Targońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz - z uwagi na wysoką jakość naukową dysertacji i jej oryginalny wkład w biologię starzenia komórek mięśni gładkich naczyń - o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Katarzyna Koziak