

Dr hab. Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk
Profesor SGGW
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie

Warszawa, 02.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej lek wet. Joanny Zdziennickiej
pt.: „Modyfikacje komórkowej odpowiedzi zapalnej w zaburzeniach układu
mięśniowo-szkieletowego u zwierząt”

(*“Modifications of the inflammatory response in disorders of musculoskeletal system in animals”*)

wykonanej w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem dr hab. Joanny Wessely-Szponder, prof. UP w Lublinie.

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dn. 24 lutego 2022 r.

Przedstawiony do oceny materiał zawiera spis treści, długą listę objaśnień skrótów i symboli zastosowanych w tekście rozprawy, streszczenie oraz słowa kluczowe w jęz. polskim i angielskim, opis pracy doktorskiej opatrzony zestawieniem publikacji tworzących cykl oraz wykaz piśmiennictwa. Całości dopełnia zestawienie dotychczasowego dorobku naukowego Doktorantki oraz rozdział Załączniki, w którym znalazły się kopie pełnych wersji publikacji składających się na oceniane osiągnięcie oraz oświadczenia o indywidualnym udziale współautorów. Warto podkreślić, że rozprawa została przygotowana prawie wyłącznie w jęz. angielskim, co zwiększa jej zasięg i krąg potencjalnych odbiorców opracowania.

Oceniana praca doktorska dotyczy procesu zapalnego, którego prawidłowy przebieg i regulacja są warunkiem naprawy tkanek układu mięśniowo-szkieletowego i przywrócenia ich funkcji po urazach. Nadmierna lub przedłużająca się aktywacja układu immunologicznego indukowana urazem może nasilać uszkodzenie tkanek, opóźnić proces gojenia, skutkować włóknieniem lub odrzuceniem implantu w przebiegu leczenia zaburzeń ortopedycznych. Motywem przewodnim rozprawy jest niezwykle istotna rola neutrofilów w odpowiedzi zapalnej, realizująca się poprzez mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe w jej pierwszej fazie oraz funkcje regulacyjne wobec innych komórek układu immunologicznego, zaangażowanych na późniejszych etapach zapalenia. Wśród czynników regulujących aktywność neutrofilów i makrofagów w przebiegu zapalenia wymienia się płytki krwi i wydzielane przez nie związki bioaktywne, co z jednej strony zwiększa złożoność mechanizmów regulacyjnych, a z drugiej, otwiera potencjalne możliwości modulowania różnych etapów odpowiedzi zapalnej w celu wspomagania procesów gojenia i leczenia. Zatem, temat rozprawy oraz ciekawe i ambitne badania przeprowadzone przez Doktorantkę, torujące drogę poszukiwaniu nowych strategii modulowania mechanizmów procesu zapalnego przy pomocy naturalnych i względnie łatwo

dostępnych preparatów krwio-pochodnych, wpisują się w aktualne wyzwania medycyny regeneracyjnej zwierząt i ludzi w aspekcie leczenia złamań kości, chorób zwyrodnieniowych stawów, czy kontuzji sportowych.

Rozprawa doktorska ma formę cyklu 4 powiązanych tematycznie oryginalnych prac twórczych pod wspólnym tytułem: "Modyfikacje komórkowej odpowiedzi zapalnej w zaburzeniach układu mięśniowo-szkieletowego u zwierząt (Modifications of the inflammatory response in disorders of musculoskeletal system in animals)". Wszystkie publikacje tworzące cykl zostały niedawno opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Artykuły zawarte w cyklu są efektem pracy zespołów autorskich, co, w mojej opinii, jest oczywiste, wobec skomplikowanych modeli doświadczalnych oraz bogactwa metodycznego prowadzonych badań. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a z przedłożonej dokumentacji wynika Jej wiodący udział w powstaniu tych prac, oszacowany na 75-80%. W jednym z artykułów Doktorantka figuruje również jako autor korespondencyjny. Powyższe dane zasługują na podkreślenie świadczą bowiem o wszechstronnym wkładzie i zaangażowaniu na każdym etapie tworzenia publikacji naukowej. Dominujący udział Doktorantki w publikacjach potwierdzają oświadczenia złożone przez współautorów prac.

Cykl otwiera publikacja wydana w 2020 r. *Journal of Equine Veterinary Science*, której celem było zbadanie aktywacji neutrofilii oraz odpowiedzi ostrej fazy i stresu oksydacyjnego u koni wierzchowych z *osteoarthritis*. Wykazano związki i dodatnie korelacje pomiędzy badanymi wskaźnikami a stopniem kulawizny u koni, co może być przydatne w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu ostrych i przewlekłych chorób zwyrodnieniowych stawów u koni. W kolejnej pracy opublikowanej w *Microorganisms* w 2021 r. wykorzystano dwa różne modele ortopedyczne (autogenny przeszczep chrząstki stawowej u królików i wszczepienie tytanowego implantu w okolicę chrząstki wzrostowej kości piszczelowej u owiec) w celu zbadania wpływu naturalnych preparatów krwio-pochodnych takich, jak: neutrofilowy ekstrakt przeciwdrobnoustrojowy, produkt degranulacji neutrofilii oraz mikropęcherzyki błonowe, na kształtowanie się fenotypu neutrofilii i makrofagów (prozapalnego lub przeciwzapalnego). Kontynuacją badań jest trzeci artykuł, który ukazał się w 2021 r. w czasopiśmie *Animals*, poświęcony potencjalnym mechanizmom zaangażowanym w niepożądane, miejscowe i ogólnoustrojowe reakcje organizmu na implanty tytanowe do ubytku kostnego u owiec. Badania te potwierdziły modulujący wpływ produktów pochodzenia neutrofilowego na mechanizmy obronne. Uwieńczeniem cyklu jest publikacja w *International Journal of Molecular Sciences* (2021), w której badano aktywność neutrofilii wyizolowanych w fazie zapalnej oraz 4 i 10 miesięcy po wszczepieniu implantów tytanowych u owiec. Stwierdzono modulujący wpływ preparatów krwio-pochodnych z różną zawartością płytek krwi i leukocytów na odpowiedź komórkową w kierunku pro- lub przeciwzapalnym.

Łączna wartość współczynnika wpływu (IF) przedstawionych publikacji wynosi 14,4, a suma punktów MEiN jest równa 350. Gwarantuje to ich wysokie walory naukowe, które zostały już ocenione przez międzynarodowych ekspertów i uznane wydawnictwa, co sprawia, że szczegółowa analiza i ocena wyników oraz ich interpretacji nie jest w recenzji konieczna.

Cykl prac ma dużą wartość naukową w aspekcie poznawczym i praktycznym i w pełni zaspokaja wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Prezentuje on nowatorskie podejście do badań komórkowej odpowiedzi zapalnej, interakcji różnych komórek w jej przebiegu oraz potencjalnych modyfikacji tego złożonego procesu przez różne produkty krwio-pochodne pochodzenia neutrofilowego i płytkowego, wskazuje także na potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. W świetle wyników badań przedstawionych w cyklu niektóre preparaty pochodzące od neutrofilii, takie, jak autologiczny przeciwdrobnoustrojowy ekstrakt neutrofilowy oraz mikropęcherzyki błonowe mogą kształtować przeciwwzapalny fenotyp makrofagów, podczas gdy inne, takie, jak produkt degranulacji neutrofilii mogą powodować prozapalną reakcję makrofagów. Podobna odpowiedź makrofagów na produkty pochodne neutrofilii zaobserwowana w dwóch różnych modelach naprawy tkanek sugeruje, że jest to prawidłowość, co rozszerza potencjalne możliwości aplikacyjne poczynionych obserwacji na różne gatunki zwierząt i różne modele procesów naprawczych. Oprócz oczywistych walorów naukowych poszczególnych prac, które przesądziły o ich opublikowaniu, należy podkreślić duży wysiłek badawczy przy ich realizacji. Artykuły są obszerne, opisują skomplikowane układy doświadczalne, w których analizowano wiele parametrów. Wyniki doświadczeń opisano i zilustrowano w czytelny sposób, co jest kluczowe dla odbioru tak bogatego materiału (dotyczącego efektów różnych produktów krwio-pochodnych, uzyskanych w różnych modelach terapii ortopedycznych i u różnych gatunków zwierząt). W moim przekonaniu, cennym uzupełnieniem cyklu oraz kontynuacją podjętej tematyki publikacyjnej byłby artykuł przeglądowy, podsumowujący wyniki doświadczeń przedstawione w rozprawie. Biorąc pod uwagę umiejętności, wyrażające się znajomością bogatego warsztatu badawczego oraz dużym zaangażowaniem na wszystkich etapach realizacji celów naukowych, znaczący udział w publikacjach tworzących cykl (średnio 78,7%) oraz wysoką aktywność w sukcesywnym upowszechnianiu wyników badań (w sumie 17 prezentacji ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, 1 poster na konferencji międzynarodowej) uważam, że Doktorantka jest w pełni gotowa do przygotowania takiej publikacji i bardzo do tego zachęcam.

Publikacjom tworzącym cykl towarzyszy krótkie opracowanie (autoreferat), które stanowi podsumowanie przeprowadzonych badań i zostało przygotowane bardzo starannie. Autorka zadbała o czytelność i przystępność materiału, poprzez podział treści na rozdziały i podrozdziały, spójność tekstu oraz opatrzenie go syntetycznymi rycinami i schematami procedur doświadczalnych. Podrozdział 4.1. "Wstęp" jest napisany zwięźle, a dobór przedstawionych treści uważam za bardzo trafny. Doktorantka bardzo sprawnie powiązała w nim ogólnobiologiczny wymiar swojej pracy (opis znaczenia i przebiegu procesu zapalnego, udział neutrofilii i makrofagów w poszczególnych fazach odpowiedzi zapalnej oraz mechanizmy, w których są zaangażowane te komórki) z niezwykle ważnym aspektem praktycznym w medycynie weterynaryjnej i ludzkiej (proces zapalny jako następstwo infekcji po zabiegach chirurgicznych, w przebiegu leczenia złamań kości, wszczepiania implantów, wspomaganie procesu regeneracji aparatu kostno-stawowego po takich zabiegach przy pomocy różnych produktów krwio-pochodnych). Na rycinach przedstawiono treści wykraczające poza zakres badań prezentowanych w rozprawie, jednak są one pomocne i cenne w zrozumieniu opisywanych procesów, ponieważ przybliżają molekularne podłoże obserwowanych zjawisk. Moja drobna uwaga do tej części opracowania dotyczy pełnych nazw: makrocząsteczki na str.

14 (DNA) oraz czynników bioaktywnych na str. 16 (IFN-alfa) i str. 19 (PDGF), które nie są właściwe. W podrozdziale 4.2. Autorka przedstawiła główne założenia swojej rozprawy, etapy badań, uzasadniła ich podjęcie oraz podkreśliła nowatorski charakter prac i potencjalne znaczenie aplikacyjne zebranych wyników. Cele rozprawy zostały sformułowane bardzo czytelnie, są zbieżne z poszczególnymi etapami pracy oraz treścią publikacji zawartych w cyklu. Uważam, że redagując cel 4. należało, oprócz analizy długoterminowej odpowiedzi układu odpornościowego na wszczepiany biomateriał, uwzględnić badanie potencjalnego wpływu produktów pochodzenia płytkowego na ten proces.

Podrozdział 4.4. "Materiały i metody" zawiera, przede wszystkim, szczegółowy i bardzo starannie przygotowany opis metod pozyskiwania różnych rodzajów komórek krwi oraz frakcji i produktów krwio-pochodnych z krwi różnych gatunków zwierząt. Ponadto, zostały opisane metody badania aktywności neutrofilii (ocena aktywności enzymów uwalnianych z ziarnistości oraz generowania NO i anionorodnika ponadtlenkowego), makrofagów (ocena generowania wolnych rodników oraz aktywności uwalnianej arginazy), metody pozyskiwania neutrofilowego ekstraktu przeciwdrobnoustrojowego, produktu degranulacji neutrofilii, mikropęcherzyków błonowych oraz produktów krwiopochodnych z różną zawartością płytek krwi i leukocytów: osocze bogato-płytkowe (zawierające leukocyty - L-PRP i pozbawione leukocytów - PURE PRP) i osocze ubogo-płytkowe (PPP). Przedstawiono opis badania cytotoksyczności i właściwości hemolitycznych neutrofilowego ekstraktu przeciwdrobnoustrojowego, stężenia haptoglobiny, fibrynogenu, jako wskaźników odpowiedzi ostrej fazy, oraz osoczonego stężenia aldehydu dimalonowego (MDA), jako wskaźnika peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego, nie zamieszczono jednak opisu mikroskopowych technik oceny aktywacji neutrofilii i makrofagów. Opis tych metod jest szczegółowy, zawiera odnośniki do poszczególnych artykułów zawartych w osiągnięciu lub do wcześniejszych opublikowanych prac zespołu. Poświęcenie wyraźnie większej części podrozdziału na przybliżenie metod oceny komórkowej odpowiedzi zapalnej jest słuszne ze względu na ich znaczenie w realizacji wytyczonych w pracy celów. Skoro jednak w rozprawie zaistniał podrozdział pt. "Badania na zwierzętach (doświadczenia *in vivo*)", należało w nim przedstawić pokrótce procedury postępowania ze zwierzętami (w formie tekstu lub schematów), wykonane zabiegi chirurgiczne, przytoczyć numery decyzji komisji etycznej oraz opisać sposób postępowania ze zwierzętami z grup kontrolnych. Większość tych informacji jest dostępna w oryginalnych artykułach tworzących cykl, jednak nie znalazłam w nich opisu postępowania ze zwierzętami z grup kontrolnych. Krótkie przedstawienie tej procedury w trakcie publicznej dyskusji nad rozprawą byłoby cennym uzupełnieniem aktualnej wersji pracy. Uważam, że w podrozdziale poświęconym metodyce badań można byłoby wyodrębnić część pod przykładowym tytułem "Modele doświadczalne procesów naprawczych wykorzystane w rozprawie doktorskiej", w którym znalazłyby się informacje dotyczące części prac badawczych z udziałem zwierząt. Taki układ treści podkreśliłby różnorodność tych modeli (różne terapie ortopedyczne u różnych gatunków zwierząt), co jest niewątpliwym atutem pracy.

Podrozdział pt. "Syntetyczna dyskusja uzyskanych wyników" jest sprawnie prowadzonym wywodem, w którym Doktorantka podsumowała rezultaty badań uzyskane w oparciu o różne modele badawcze, wskazała na ich powtarzalność w różnych warunkach doświadczalnych oraz

podkreśliła nowatorski charakter prowadzonych obserwacji i ich znaczenie dla rozwoju potencjalnych strategii wspomagania procesu regeneracji w leczeniu urazów kostno-stawowych u zwierząt. W moim przekonaniu, ciekawym uzupełnieniem dyskusji w autoreferacie byłyby próba wskazania potencjalnych przyczyn/mechanizmów odmiennego efektu neutrofilowych ekstraktów przeciwdrobnoustrojowych pochodzenia autologicznego i heterologicznego na kształtowanie fenotypu makrofagów w podtyp prozapalny lub przeciwzapalny.

Wnioski z przeprowadzonych badań są trafne, w pełni poparte uzyskanymi wynikami i ściśle zbieżne z wytyczonymi celami pracy. Wniosek 5. jest właściwie podsumowaniem wartości merytorycznej całej pracy. Spis piśmiennictwa liczy 45 pozycji, spośród których połowa to artykuły opublikowane w czasie ostatnich 5 lat, co świadczy o aktualności i powadze podjętej tematyki badawczej. Rozdział 5 zawiera dane bibliometryczne artykułów naukowych przedstawionych jako osiągnięcie w przewodzie doktorskim.

Podsumowując, przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Zawarte w recenzji uwagi i komentarze dotyczą etapu redagowania opracowania jako całości, mogą być dyskusyjne i nie umniejszają wartości dzieła. Opisane eksperymenty są nowatorskie, łączą obserwacje i problemy kliniczne, analizy biochemiczne i mikroskopowe, techniki hodowli i testów *in vitro*. Opracowanie ma walory interdyscyplinarne, uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą roli różnych komórek i czynników w przebiegu i regulacji procesu zapalnego oraz miejscowych i ogólnoustrojowych reakcji organizmu na biomateriały stosowane w leczeniu zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Tym samym, stanowią cenny wkład w rozwój nauk biomedycznych i mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o podjęcie dalszych czynności w przewodzie doktorskim lek. wet. Joanny Zdziennickiej. Jednocześnie, ze względu na duży wysiłek badawczy zmierzający do realizacji ambitnego celu oraz wartość poznawczą i praktyczną uzyskanych wyników wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.


Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk