

Prof. dr hab. inż. Jakub D. Rybka
Centrum NanoBioMedyczne
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Wszechnicy Piastowskiej 3
61-614 Poznań
e-mail: jrybka@amu.edu.pl

Poznań, 27.04.2025

Recenzja

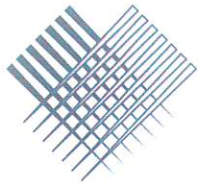
rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Żukowskiej
pt. „Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach *in vitro*,
in vivo oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową”
wykonanej pod kierunkiem prof. UPP dr hab. inż. Joanny Zeyland
oraz prof. UPP dr hab. Joanny Perła-Kaján
na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

1. Ocena formalna rozprawy

Pod względem formalnym, rozprawa stanowi opracowanie liczące 131 stron. Zawiera wszystkie elementy, które powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej, tj. aktualny przegląd stanu wiedzy, sformułowane cele pracy, opis materiałów i metodyki badawczej, opracowanie wyników, ich dyskusję oraz końcowe wnioski. Praca została ujęta w postaci sześciu rozdziałów, zawiera także wykaz skrótów, streszczenie w dwóch wersjach językowych, wykaz tabel i rycin oraz bibliografię (151 pozycji). Wyniki zostały zilustrowane za pomocą 29 rysunków i 20 tabel. Warto zaznaczyć, że wykaz tabel i rycin byłby bardziej przejrzysty, gdyby ryciny i tabele zostały wylistowane osobno.

Na podstawie bazy Scopus mgr A. Żukowska jest autorką jednej publikacji o charakterze przeglądowym opublikowanej w 2024 roku wraz z promotorem pomocniczym w czasopiśmie *Postępy Biochemii* (Volume 70, Issue 3, Pages 336 – 347) pt. *Histony łącznikowe H1 w chorobach człowieka*.

Na podstawie oświadczenia należy dodać, że doktorantka jest autorką jeszcze jednego artykułu z roku 2021 w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* pt. *Induction of the Stringent Response Underlies the Antimicrobial Action of Aliphatic Isothiocyanate*.



2. Ocena celu rozprawy i trafności tematu

Celem pracy jest zbadanie wzajemnych zależności między poziomem homocysteiny a obecnością histonów zewnątrzjądrowych i zewnątrzkomórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem histonów H1, w **kontekście rozwoju i progresji chorób neurodegeneracyjnych oraz sercowo-naczyniowych**. Hipoteza zakłada, że podwyższony poziom homocysteiny sprzyja wzrostowi ilości histonów poza jądrem i komórką, a ich interakcje mogą być markerami lub czynnikami pogarszającymi stan patologiczny. Badania przeprowadzono na liniach komórkowych, modelach mysich (ApoE KO, SOD1) oraz materiale od pacjentów kardiologicznych.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania nad rolą homocysteiny na zewnątrzjądrowe histony, jako czynniki schorzeń sercowo-naczyniowych i neuroregeneracyjnych, może stanowić podstawę do dalszych badań nad wykorzystaniem omawianych białek, jako biomarkery do śledzenia progresu wskazanych schorzeń. Uzyskane wyniki przyczyniły się realizacji projektów finansowanych z NCN, tj. OPUS 2019/33/B/NZ4/01760: *Mechanizmy epigenetycznych modyfikacji histonów w hiperhomocysteinemii* oraz 2021/43/B/NZ3/01008: *Mechanizmy zaburzeń wczesnego rozwoju zarodka w hiperhomocysteinemii*.

Wyniki oraz wnioski wynikające z przeprowadzonych badań mogą doprowadzić do powstania **nowych strategii zapobiegania i diagnostyki patologii reprodukcji związanych z hiperhomocysteinemią**, co stanowi istotny wkład w rozwój osiągnięć w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

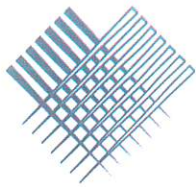
Należy jednak zauważyć pewną rozbieżność - tytuł rozprawy odnosi się do chorób zakrzepowo-zatorowych, co sprawia, że pozornie obecność rozdziałów dotyczących schorzeń neurodegeneracyjnych wydaje się nieuzasadniona.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Wprowadzenie do tematyki i cele badawcze

Rozdział poświęcony histonom oraz ich wariantom został opracowany poprawnie, jednak nadmiar informacji utrudnia jego odbiór. Doktorantka przeanalizowała szereg schorzeń, których podstawą jest hiperhomocysteinemia i wskazała kilka technik niezbędnych do identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych.

Jak już wspomniałem tytuł rozprawy odnosi się do chorób zakrzepowo-zatorowych, co sprawia, że obecność rozdziałów dotyczących schorzeń neurodegeneracyjnych wydaje się nieuzasadniona. Dodatkowo, wstęp kończy podrozdział zatytułowany *Osie organ-organ*, brakuje tu podsumowania i odniesienia do głównej problematyki pracy.



Wszystkie przedstawione podrozdziały zawierają istotne i poprawne informacje, jednak brak spójności i ciągu przyczynowo-skutkowego sprawia, że wstęp bardziej przypomina pewnien podręcznikowy wykaz danych niż logicznie powiązaną narrację. Dopracowanie wstępu o stosowne podsumowanie mogłoby zwiększyć klarowność oraz zgodność z tematem rozprawy.

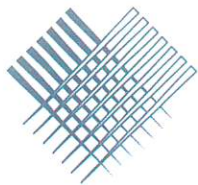
Hipoteza badawcza zakładała istnienie korelacji pomiędzy poziomami homocysteiny a zewnątrzkomórkowych i/lub zewnątrzjądrowych histonami, co może wpływać na progres stanów patologicznych, dzięki czemu dwa wskazane białka będzie można wykorzystać jako biomarkery.

Do weryfikacji hipotezy wykorzystano komercyjne linie komórkowe, modele mysie choroby sercowo-naczyniowej, Alzheimer'a i stwardnienia zanikowego bocznego oraz materiale od pacjentów z VTE. I tutaj kolejna rozbieżność z tytułem rozprawy, który jednoznacznie nawiązuje do chorób kardiologicznych.

Metodyka badawcza

Opis zastosowanych odczynników jest bardzo ubogi. Sprowadza się do jednego zdania. Opis pozostałej części metodyki badawczej jest przygotowany starannie, jednak zawiera kilka nieścisłości jak np. *traktowanie komórek*, gdzie Autorka opisuje przygotowanie hodowli komórkowej do dalszych eksperymentów. W przypadku opisu metod oznaczania stężenia białek bazując na krzywych kalibracyjnych, brakuje informacji o liczbie punktów pomiarowych, współczynniku korelacji oraz granic wykrywalności i oznaczalności, co ma istotny wpływ na wiarygodność i istotność statystyczną pomiarów. Podobnie w pozostałych technikach, jak np. HPLC nie ma informacji, ani przykładowej krzywej kalibracyjnej. Część dotycząca metodyki została zakończona krótkim podrozdziałem o statystycznej analizie danych, co pozwala przypuszczać, że pomiary były powtarzane i analizowane, natomiast nie zostało to dostatecznie opisane w tej części pracy.

Należy jednak podkreślić, że w Doktorantka wykorzystwała szereg metod badawczych do analizy białek, od podstawowych takich jak elektroforeza czy Western/dot blotting, czy ELISA, aż po mikroskopię optyczną, konfokalną czy chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas, co podnosi jakość naukową rozprawy.



Wyniki i ich omówienie

Zasadniczą wadą rozdziału prezentującego wyniki jest to, że wszystkie zdjęcia pochodzące z mikroskopii, czy to optycznej (choć tego też nie wskazano), czy konfokalnej są pozbawione skali. Ponadto, niektóre z wykresów nie zawierają jednostek, jak np. Rycina 24 cz 26.

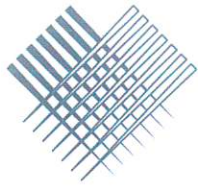
Przeprowadzone badania wykazały istotną zależność pomiędzy poziomem homocysteiny a obecnością zewnątrzkomórkowych histonów, szczególnie H1. Stres wywołany podwyższonym stężeniem homocysteiny i jej tiolaktanu (HTL) prowadził do zwiększonej ekspresji histonu H1 i jego przemieszczania do jądra komórkowego oraz cytoplazmy. Dodatkowo, zarówno Hcy, HTL, jak i traktowanie komórek histonami powodowały deregulację metabolizmu jednowęglowego, skutkując wzrostem stężenia tHcy w medium komórkowym.

W modelach mysich (ApoE KO i SOD1) zaobserwowano istotny wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego histonu H1, przeciwciał anti-H1 IgG oraz tHcy w osoczu w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Zmiany te były również obecne w różnych narządach (mózg, wątroba, śledziona), choć nie wykazano istotnych różnic w poziomie tHcy w mózgu obu modeli. Wyniki sugerują także możliwość istnienia interakcji organ–organ, w których histony zewnątrzjądrowe mogą pełnić funkcję sygnałową.

Ponadto, wykazano, że zwiększone poziomy Hcy i HTL wpływają na potranslacyjne modyfikacje histonów (PTM), potencjalnie zaburzając ich funkcjonowanie. W osoczu pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (VTE) i hiperhomocysteinemią (HHcy) stwierdzono podwyższone poziomy histonu H1 oraz przeciwciał anti-H1 IgG w porównaniu do pacjentów z prawidłowym poziomem Hcy. Wykazano, że zarówno homocysteina, jak i wiek są czynnikami determinującymi poziom histonu H1 w osoczu osób z VTE.

Dyskusja wyników jest obszerna i interesująca, jednak w znacznej większości nie odnosi się do rozdziału z wynikami, w wielu miejscach brakuje odnośników do konkretnego rysunku czy tabeli, co sprawia, że recenzent musi sam tych informacji szukać i analizować, które elementy dyskusji operują się na uzyskanych badaniach, a które na danych literaturowych.

Mimo szeregu uchybień i niespójności, przedłożona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim była próba znalezienia korelacji pomiędzy histonami zewnątrzjądrowymi a homocysteiną w wybranych stanach patofizjologicznych. Autorka dokonała analizy modeli *in vitro* i *in vivo*, a także poddała testom materiał pobrany od pacjentów, co podnosi nie tylko wartość merytoryczną, ale także aplikacyjną prowadzonych badań.



4. Uwagi końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Żukowskiej pt.: „Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową” wnosi do nauki elementy poznawcze i ma znaczenie dla praktyki. Doktorantka, poprzez realizację badań omawianych w rozprawie, dowiodła, że opanowała wiedzę w dziedzinie nauk podstawowych, a także w zakresie biotechnologii i nauk medycznych. Wykazała się dużą inwencją naukową i techniczną przy planowaniu i realizacji prac badawczych, w stopniu zapewniającym możliwość samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując, stwierdzam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w szczególności odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniacji i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) i **wnoszę o dopuszczenie Pani Adrianny Żukowskiej do publicznej obrony.**

Jakub Dybka