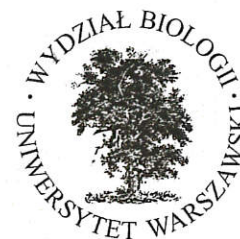




UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Zoologii, Zakład Cytoologii
Dr hab. Edyta Brzóska-Wójtowicz



Warszawa, 26.02.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Iwony Bronisz-Budzyńskiej pod tytułem:

**„The role of Nrf2 transcription factor in muscle regeneration
and Duchenne muscular dystrophy”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Iwony Bronisz-Budzyńskiej pod tytułem: „The role of Nrf2 transcription factor in muscle regeneration and Duchenne muscular dystrophy” została wykonana pod opieką profesora dr hab. Józefa Dulaka, w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Rozprawa Kandydatki jest pracą projektową i spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Problem naukowy rozprawy

Pani mgr Iwona Bronisz-Budzyńska prowadziła badania dotyczące roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w różnicowaniu komórek miogenicznych, regeneracji mięśni szkieletowych i mysim modelu dystrofii Duchenna. Badany czynnik reguluje transkrypcję ponad 600 genów, których produkty zaangażowane są w regulację biogenezy i funkcji mitochondriów, odpowiedź przeciwzapalną, odpowiedź na stres oksydacyjny, metabolizm hemu, gospodarkę wapniową oraz pełnią ważną rolę cytoprotekcyjną w komórkach. Do aktywacji ścieżek zależnych od Nrf2 dochodzi między innymi w wyniku stresu oksydacyjnego. Zważywszy na funkcje Nrf2, poznanie jego roli jest niezwykle istotne w przypadku chorób, związanych ze stresem oksydacyjnym. Dystrofia mięśniowa Duchenna jest chorobą genetyczną, w której brak funkcjonalnego białka dystrofiny, prowadzi między innymi do powtarzających się cykli uszkodzenia oraz rekonstrukcji mięśni szkieletowych. Towarzyszy temu chroniczny stan zapalny oraz produkcja reaktywnych form tlenu. W efekcie rozwoju choroby dochodzi do pojawienia się tkanki łącznej i tłuszczowej w obrębie mięśni szkieletowych oraz osłabienia ich siły. Biorąc pod uwagę znane funkcje czynnika Nrf2, problematyka badawcza podjęta w rozprawie doktorskiej wydaje się niezwykle ważna i interesująca.

ul. Ili Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 200, faks: 22 55 42 202
e-mail: edbrzoska@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wykazuje wiedzę teoretyczną Kandydatki w danej dyscyplinie naukowej. Rozprawa została opatrzona bardzo dobrym teoretycznym wstępem, który wprowadza w podjętą tematykę badawczą. Moim zdaniem we wstępie zabrakło wyraźnego oddzielenia informacji dotyczących prawidłowej/fizjologicznej regeneracji mięśni, od danych dotyczących dystrofii mięśniowej. Pojawiło się także kilka nieścisłości. W rozdziale dotyczącym regeneracji mięśni Autorka pracy podaje informację, że komórki satelitowe w stanie spoczynkowym nie ekspresują mięśniowych czynników regulatorowych. W kolejnym zdaniu czytamy natomiast, że komórki te wykazują ekspresję Myf5, co jest oczywiście zgodne z danymi literaturowymi. Zastanawiające jest także użycie terminu „adult myoblasts”, w kontekście opisywanego różnicowania mioblastów podczas regeneracji mięśni. W rozprawie zawarto również informację, że w dystrofii mięśniowej Duchenna czynniki wydzielane przez komórki stanu zapalnego wpływają na proliferację komórek satelitowych. Podczas gdy, procesy te mają również miejsce w prawidłowej regeneracji mięśni. Pani mgr Iwona Bronisz-Budzyńska określiła jasno cel swoich badań. Uważam, że dobrym uzupełnieniem byłoby postawienie wyraźnej hipotezy badawczej. Niemniej jednak powyższe uwagi nie wpływają na bardzo wysoką ocenę merytoryczną przygotowanej rozprawy.

Rozwiązanie problemu naukowego i metodyka badawcza

Autorka rozprawy skoncentrowała się na kilku ważnych aspektach potencjalnej roli Nrf2 w rekonstrukcji mięśni szkieletowych. Kandydatka prawidłowo dobrała metody badawcze. Pani mgr Iwona Bronisz-Budzyńska przeprowadziła szereg bardzo dobrze zaplanowanych i wykonanych eksperymentów. Badania Autorki rozprawy obejmowały analizy prowadzone z użyciem unieśmiertnionych mioblastów linii C2C12, a także, co niezwykle cenne, mioblastów uzyskanych w wyniku hodowli pierwotnych komórek satelitowych. Ponadto, przeprowadzono eksperymenty *in vivo*, wykorzystując model uszkodzenia mięśnia przy pomocy kardiotoksyny oraz mysi model dystrofii mięśniowej Duchenna, czyli myszy *mdx*. Kandydatka analizowała komórki wykazujące nadekspresję białka Nrf2, a także mioblasty uzyskane z myszy transgenicznymi, nie wykazujących ekspresji aktywnego transkrypcyjnie Nrf2. Różnorodność zastosowanych modeli oraz metodyki badawczej pozwoliła Autorce rozprawy na uzyskanie bardzo interesujących wyników. Jedyna uwaga w kwestii metod dotyczy analizy stanu zapalnego na preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną, w trzecim dniu regeneracji. Na podstawie przedstawionych barwień ocena stanu zapalnego nie jest precyzyjna. Badania takie powinny być uzupełnione analizami cytometrycznymi lub immunocytochemicznymi. Na wyróżnienie natomiast zasługuje szerokie spektrum przeprowadzonych badań. Wykonane analizy mają z jednej strony wiele wątków, jednakże zachowują myśl przewodnią. Zapoznanie się z uzyskanymi rezultatami było bardzo interesujące. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że Kandydatka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 200, faks: 22 55 42 202
e-mail: edbrzoska@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Uzyskane wyniki i ich znaczenie

Wyniki pracy są przedstawione jasno i starannie, zostały również prawidłowo przeanalizowane. Kandydatka umiejętnie przedstawiła wnioski ze swojej pracy. Na podstawie rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pani mgr Iwona Bronisz-Budzyńska wykazała wpływ aktywności transkrypcyjnej Nrf2 na przeżywalność, proliferację i różnicowanie mioblastów oraz różnice w odpowiedzi komórkowej na brak aktywności transkrypcyjnej badanego czynnika w warunkach normoksji i hipoksji. Autorka rozprawy udowodniła, że brak ekspresji funkcjonalnego Nrf2 nie wpływa znacząco na kondycję mięśni myszy mdx. Najciekawsze wyniki dotyczą roli Nrf2 w regeneracji uszkodzonych poprzez długotrwały wysiłek fizyczny mięśni myszy mdx, u których zaobserwowano zwiększony stan zapalny i nekrozę włókien mięśniowych. Rola recenzentki daje mi jednak przywilej zadania kilku pytań i uwag dotyczących uzyskanych wyników.

W części, dotyczącej różnicowania mioblastów uzyskanych z hodowli pierwotnych komórek satelitowych izolowanych z mięśni myszy kontrolnych i transgenicznych, Autorka przedstawiła reprezentatywne zdjęcia analiz immunocytochemicznych lokalizacji miogeniny i ciężkich łańcuchów miozyny. Na ich podstawie oceniono wydajność różnicowania. Dobrym uzupełnieniem tej części byłyby badania ilościowe, takie jak wyznaczenie indeksu fuzji.

Kolejna uwaga dotyczy różnicowania mioblastów uzyskanych z myszy kontrolnych i transgenicznych w normoksji i hipoksji. Czy zaobserwowane różnice w indeksie fuzji wynikają ze zmian w procesie różnicowania komórek czy też ich proliferacji? Komórki, które słabiej proliferują i jest ich niższa liczba, mniej wydajnie również różnicują. Nasuwa się tutaj również pytanie, czy w uszkodzonym mięśniu myszy, nie wykazujących ekspresji aktywnego transkrypcyjnie Nrf2, komórki satelitowe proliferują równie wydajnie co w mięśniu kontrolnym? W pracy przedstawiono co prawda analizę liczby komórek satelitowych Pax7+ i Myod+ oraz komórek proliferujących, jednakże w mięśniach nieuszkodzonych, w których proliferacja komórek satelitowych jest ograniczona.

Ostatnie czysto teoretyczne pytanie dotyczy potencjalnej roli czynnika Nrf2 w regeneracji mięśni wolno-kurczących się i szybko-kurczących się, które różnią się, między innymi odpowiedzią na stres oksydacyjny. Badania w przedstawionej rozprawie przeprowadzono na mięśniu *gastrocnemius*, który zawiera obydwie typy włókien mięśniowych. Czy możemy się spodziewać różnic w regeneracji mięśni wolno-kurczących się i szybko-kurczących się u myszy nie wykazujących ekspresji aktywnego transkrypcyjnie Nrf2?

Forma pracy

Rozprawa doktorska jest pracą projektową i ma typowy dla tego rodzaju prac układ. Praca jest opatrzona dobrym streszczeniem w języku angielskim i polskim, a także wykazem skrótów. Wszystkie części rozprawy to jest: wstęp, cel, materiały i metody, opis uzyskanych wyników, dyskusja, konkluzje, spis piśmiennictwa zostały przygotowane z należytą starannością i są kompletne. Jedyna uwaga dotyczy zdjęć z analiz histochemicznych i przeżyciowych komórek, które często są nieczytelne. Ponadto na rycinie 21 i 22 umieszczono te same zdjęcia, czyli ten sam wariant eksperymentu pokazano dwukrotnie.

Wniosek końcowy

Podsumowując mogę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w swojej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią pracy badawczej. W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Iwony Bronisz-Budzyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. Edyta Brzoska-Wójtowicz, prof. ucz.

