



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytoologii
Dr hab. Edyta Brzóska-Wójtowicz, prof. ucz.

Warszawa, 31.08.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Olgi Muchy pod tytułem:
„Simvastatin administration in *mdx* mice and miR-378 deletion in glycerol-induced injury model as potential therapeutic approaches in the treatment of Duchenne muscular dystrophy ”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Olgi Muchy pod tytułem: „Simvastatin administration in *mdx* mice and miR-378 deletion in glycerol-induced injury model as potential therapeutic approaches in the treatment of Duchenne muscular dystrophy ” została wykonana pod opieką pani profesor Agnieszki Łobody, w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Rozprawa Kandydatki jest pracą projektową i spełnia wymogi 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 Olga Mucha prowadziła badania dotyczące wpływu statyn na funkcjonalność dystroficznych mięśni oraz roli miR-378 w przebiegu regeneracji mięśni szkieletowych uszkodzonych glicerolem. Waga badań nad potencjalnymi strategiami terapeutycznym dystrofii mięśniowej Duchenne’a nie wymaga komentarza. Dystrofia mięśniowa Duchenne’a jest najczęściej spotykanym i najbardziej znanym typem dystrofii. U podłoża choroby leży brak istotnego dla integralności i funkcjonowania mięśni białka dystrofiny, co w konsekwencji prowadzi do atrofii i utraty funkcji mięśni szkieletowych. Przedwczesna śmierć pacjentów spowodowana jest niewydolnością krążeniowo-oddechową. W pracy doktorskiej badania prowadzono na dwóch modelach tej choroby tj.: dystroficznych myszach *mdx*, charakteryzujących się brakiem funkcjonalnej dystrofiny oraz myszach z zaindukowanym glicerolem uszkodzeniem mięśni. Jak słusznie zauważono w pracy, każdy z tych modeli dostarcza innych informacji, które zbliżają nas do poznania mechanizmu choroby. Doktorantka dobrze uzasadniła wybór simwastatyny oraz miR-378 jako potencjalnej terapeutyki. Zagadnienie to jest bardzo

istotne zwłaszcza w przypadku statyn, przy stosowaniu których, efektem ubocznym mogą być uszkodzenia i bóle mięśni szkieletowych.

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. Pani mgr Olga Mucha prawidłowo określiła cel swoich badań. Uważam, że dobrym uzupełnieniem byłoby postawienie jasno sformułowanej hipotezy badawczej. Niemniej jednak powyższa uwaga nie wpływa na bardzo wysoką ocenę merytoryczną przygotowanej rozprawy.

Rozwiązanie problemu naukowego i metodyka badawcza

Autorka pracy podjęła dwa wątki badawcze, w pierwsza część wyników poświęcona jest wpływowi simwastatyny na mięśnie szkieletowe myszy *mdx*, druga roli miR-378 w rekonstrukcji uszkodzonych mięśni. Obydwa zagadnienia łączy poszukiwanie potencjalnych strategii terapii dystrofii mięśniowej Duchenne'a. W celu rozwiązania problemu naukowego Doktorantka zastosowała całe spektrum metod, począwszy od analiz funkcjonalnych, poprzez histologiczne, immunocytochemiczne, a także hodowle komórkowe, sortowanie komórek, spektrometrię mas, sekwencjonowanie i liczne analizy molekularne. Zapoznanie się z uzyskanymi rezultatami było zatem bardzo interesujące. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że każde z podjętych przez Doktorantkę zadań badawczych było analizowane wieloaspektowo. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że Kandydatka posiada umiejętność samodzielnego planowania, prowadzenia i przedstawiania rezultatów swojej pracy naukowej.

Rola recenzentki daje mi jednak przywilej sformułowania kilku uwag dotyczących prezentacji uzyskanych wyników i metodyki. Po pierwsze w opisie wyników nie podano jakiego typu analizy statystyczne zostały przeprowadzone, w opisie metod Autorka wymienia dwa testy. Na wykresach (rycina 13-22) jako istotne zaznaczono wyłącznie różnice pomiędzy grupą kontrolną (WT) i kontrolnymi myszami *mdx*, podczas gdy różnica pomiędzy myszami kontrolnymi (WT) oraz myszami, którym podawano simwastatynę również wydaje się istotna statystycznie. Rozumiem, że celem pracy było porównanie myszy *mdx* kontrolnych i otrzymujących simwastatynę. Jednakże taki sposób prezentowania różnic statystycznych moim zdaniem powinien zostać skomentowany w tekście. Po drugie, analizę danych ułatwiłaby informacja, które warianty są ze sobą porównywane (strona 67, ostatnie zdanie; podrozdział 7.2.3). Czasami informacji tej należy się domyślać podczas czytania. Ponadto, w pracy nie ma informacji o tym jak uzyskano myszy z podwójnym knock-outem genów *mdx/miR278*-. Są to dane opublikowane, niemniej jednak kilka słów na temat metodyki, czy też źródła ich uzyskania byłoby ważne.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie

Wyniki pracy są przedstawione jasno i starannie, zostały również prawidłowo przeanalizowane i przedyskutowane. Kandydatka umiejętnie sformułowała wnioski ze swojej pracy. Na podstawie rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pozwolę sobie na zadanie kilku pytań dotyczących uzyskanych rezultatów:

1. W swojej rozprawie doktorskiej Kandydatka w rozdziale 7.2.5 stwierdza, że podawanie simwastatyny nie wpływa na przebieg regeneracji mięśni szkieletowych. Jednakże u myszy, którym podawano lek obserwowano większą średnicę włókien i mniejszy procent włókien z centralnie położonym jądrem komórkowym, czyli nowopowstałych/wczesnych włókien mięśniowych. Czy jest możliwe, że podawanie simwastatyny przyspiesza dojrzewanie włókien mięśniowych? Czy analizy *in vitro* różnicowania komórek miogenicznych w obecności simwastatyny mogły by wyjaśnić ten mechanizm?
2. Myszy *mdx* są bardzo ważnym i interesującym modelem w badaniach nad dystrofią. Mają jednak stosunkowo łagodne/umiarkowane objawy braku białka dystrofiny. Większe zmiany obserwuje się w mięśniach myszy *mdx* poddanych wysiłkowi fizycznemu, u których występuje zwiększony stan zapalny i nekroza włókien mięśniowych. Wykazano to między innymi w badaniach prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Medycznej UJ. Czy podawanie simwastatyny w takim układzie mogłoby wnieść dodatkowe nowe informacje na temat potencjału tego leku?
3. Kolejne pytanie dotyczy roli miR-378. Zwiększoną zdolność do wysiłku, zmniejszoną fibrozę oraz mniejszą liczbę fibro-adipogennych komórek progenitorowych (FAP) obserwowano u myszy z podwójnym knock-outem genów *mdx/miR-378*^{-/-}. Istotna wydaje się zatem informacja, czy w mięśniach takich myszy obserwowano również zmiany zawartości tkanki tłuszczowej?
4. Ostatnie pytanie odnosić się do rozdziału 7.4.8, dotyczącego adipogenezy u myszy *miR-378*^{-/-} z uszkodzeniem mięśni wywołanym glicerolem. Z tytułu rozdziału dowiadujemy się, że u opisanych myszy brak miR-378 prowadzi do obniżonej adipogenezy w dniu 7 regeneracji. W podpisie do stosowej ryciny (42) znajduje się informacja o tym, że brak miR-378 nie wpływa na akumulację tkanki tłuszczowej w dniu 7. Dodatkowo, niestety, nie przedstawiono danych ilościowych dotyczących akumulacji tkanki tłuszczowej w mięśniach w dniu 7 po uszkodzeniu. Zaprezentowano natomiast bloty pokazujące zwiększony poziom markera adipocytów – białka FABP4, w dniu 14 regeneracji. Analiza ilościowa lub półilościowa blotów ułatwiłaby interpretację wyników. Jak zaprezentowane wyniki mają się do tytułu rozdziału, zwłaszcza, że

we wnioskach pracy zwrócono uwagę na brak wpływu delekcji miR-378 na akumulację tkanki tłuszczowej?

5. W mojej opinii ważnym uzupełnieniem pracy byłoby także sformułowanie ogólnego wniosku, weryfikacji postawionej hipotezy badawczej poza świetnie przygotowanym podsumowaniem wyników.

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. Piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane i jest bardzo obszerne. Nieliczne uwagi co do formy pracy to: zbyt oszczędne podpisy rycin we wstępie, nieprecyzyjne zdania w streszczeniu (linia 6, 21, 26, 32 strona 9), nieczytelne zdjęcia z analiz histologicznych (rycina 16,18,20,25,31,32,35).

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 Olgi Muchy 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 i dorobek naukowy Doktorantki wnioskuję o jej wyróżnienie.

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