



Poznań, 19 marca 2024 r.

dr hab. n. farm. Jarosław Paluszczyk
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Recenzja w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne
Pani dr Anecie Stachowicz, adiunktowi badawczemu w Katedrze Farmakologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na uchwałę Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 16 stycznia 2024 roku w sprawie powołania komisji habilitacyjnej w celu przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne wszczętego na wniosek dr n. med. Anety Stachowicz z dnia 29 września 2023 r.

1. Sylwetka Kandydatki

Pani Aneta Stachowicz ukończyła studia magisterskie na kierunku biofizyka w 2010 roku. W latach 2011-2015 była słuchaczką interdyscyplinarnych studiów doktoranckich „Nauki molekularne dla medycyny”, uzyskując stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej w październiku 2015 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Badania nad rolą mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) w patogenezie miażdżycy, depresji i neurodegeneracji” przygotowanej pod opieką promotorską profesor Agnieszki Basty-Kaim oraz profesora Rafała Olszaneckiego. Po uzyskaniu stopnia doktora Kandydatka została zatrudniona w Katedrze Farmakologii Collegium Medicum UJ na stanowisku naukowo-technicznym, a od października 2020 roku na stanowisku adiunkta badawczego.

2. Ocena osiągnięcia stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego
Osiągnięcie pt. „Zastosowanie metod proteomicznych do poszukiwania molekularnych mechanizmów wpływających na fenotypowe różnicowanie komórek w chorobach układu krążenia o podłożu zapalnym” stanowi cykl trzech oryginalnych wieloautorskich publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 18,808$ oraz punktacji $MNiSW = 340$ punktów. Prace zostały opublikowane w latach 2021–2023 w recenzowanych czasopismach naukowych: International Journal of Molecular Sciences ($IF_{2021} = 6,208$), Journal of Inflammation ($IF_{2022} = 5,1$) oraz Biomedicine & Pharmacotherapy ($IF_{2023} = 7,5$). Kandydatka jest pierwszym autorem we wszystkich trzech pracach, a w pracy H1 [Int J

Mol Sci 2021] pełni także funkcję autora do korespondencji. Deklarowany wkład Habilitantki w powstanie poszczególnych prac eksperymentalnych obejmował udział w tworzeniu koncepcji badań i planu doświadczeń; przeprowadzenie oznaczeń proteomicznych i metabolicznych; wykonanie oznaczeń poziomu białek i transkryptów technikami Western blot, ELISA, qPCR; prowadzenie eksperymentów w modelu *in vitro*; a także analizę i opracowanie danych oraz przygotowywanie manuskryptów do publikacji. Analiza opisu zadań wykonanych przez Habilitantkę, w połączeniu z oświadczeniami współautorów dotyczącymi zakresu ich zaangażowania, pozwala wnioskować o dominującym wkładzie dr Stachowicz w powstanie prac ujętych w ramach cyklu habilitacyjnego.

Choroby układu krążenia stanowią istotny problem kliniczny, a aktualne sposoby oddziaływania farmakologicznego w stanach miażdżycowych i niewydolności serca są wciąż niewystarczające. Zasadne jest więc poszukiwanie nowych, skutecznych oddziaływań, zmniejszających ryzyko zaostrzeń i powikłań u pacjentów. Habilitantka w swoim osiągnięciu weryfikowała aktywność dwóch związków o znanych punktach uchwytu: diminazenu – aktywatora enzymu konwertazy angiotensyny ACE2, oraz BB-CI-amidyny – inhibitora deiminaz białkowo-argininowych PAD, pod kątem ich wpływu na procesy różnicowania makrofagów i fibroblastów. Skupienie uwagi na mikrośrodkowisku stanowi cenne podejście, z uwagi na duże znaczenie plastyczności i zmian w niszy komórkowej tworzącej mikrośrodkowisko zapalne dla patologicznej przebudowy tkanki.

Celem publikacji H1 było określenie wpływu diminazenu na polaryzację makrofagów do prozapalnej populacji M1 oraz przeciwzapalnej populacji M2. Habilitantka założyła, że zmiana stosunku subpopulacji makrofagów na korzyść M2 wpłynie na przebieg procesu miażdżycowego w układzie modelowym myszy z wyłączonym genem apolipoproteiny E. Stosowanie diminazenu nie spowalniało procesu miażdżycowego, jednak prowadziło do powstawania bardziej stabilnych blaszek miażdżycowych u myszy na diecie wysoko-tłuszczowej. Zaobserwowano obniżenie infiltracji blaszek przez makrofagi, a ponadto podwyższenie odsetka makrofagów subpopulacji M2. W modelu *in vitro*, z wykorzystaniem komórek monocytów linii THP-1 Habilitantka wykazała promowanie różnicowania makrofagów w kierunku subpopulacji M1 i M2 pod wpływem diminazenu. Warto wskazać, że takie rozbieżności mogą być związane z różnicami w szczegółowym mechanizmie działania związku badanego w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Dodatkowym efektem działania diminazenu było zmniejszenie stłuszczenia wątroby u myszy. Analiza proteomu komórek wątroby zwierząt laboratoryjnych pozwoliła wskazać, że obserwowane efekty farmakologiczne mogą być powiązane z podwyższaniem poziomu tauryny na skutek zwiększania ekspresji dekarboksylazy kwasu cysteinowo-sulfonowego (CSAD) pod wpływem diminazenu.

W kolejnej pracy z cyklu [H2] Habilitantka weryfikowała wpływ inhibitora deiminaz białkowo-argininowych (PADs) – BB-CI-amidyny, na polaryzację makrofagów w modelu *in vitro* wykorzystującym monocyty linii THP-1. Zaobserwowano, że subpopulacje makrofagów różnią się poziomem ekspresji genów kodujących izoforny PADs, a komórki subpopulacji M2 cechowały się znaczącym obniżeniem poziomu ekspresji PAD2. Jednocześnie BB-CI-amidyna promowała

różnicowanie makrofagów w kierunku subpopulacji przeciwzapalnych makrofagów M2, co zostało określone poprzez analizę poziomu ekspresji odpowiednich markerów różnicowania. Ponownie wykorzystano analizę proteomu do oceny mechanizmu działania badanej substancji. Stwierdzono, że obserwowane efekty mogą wynikać ze zmiany poziomu białek powiązanych z aktywnością szlaku NF- κ B, który jest zaangażowany w regulację odpowiedzi zapalnej. Również wyciszenie ekspresji PAD2 przy pomocy siRNA zwiększyło polaryzację makrofagów do fenotypu M2, co było związane ze zmianami w profilu białek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną.

Aktywność BB-Cl-amidyny badano także w publikacji H3, w której określono wpływ tej substancji na różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów. Taka koncepcja badawcza była oparta na danych literaturowych wskazujących na powiązanie zwiększonej ekspresji PADs ze zwłóknieniem serca. Zauważono, że ludzkie płodowe fibroblasty wyizolowane z serca wykazują ekspresję PADs, a zróżnicowane pod wpływem ekspozycji na TGF- β 1 miofibroblasty wykazywały zwiększoną ekspresję PAD1. Z kolei BB-Cl-amidyna hamowała różnicowanie fibroblastów stymulowane przez TGF- β 1. Ponownie, wykonano analizę proteomiczną w celu identyfikacji zmian w poziomie białek, aby możliwe było zaproponowanie hipotezy dotyczącej mechanizmu działania badanego inhibitora PADs. Stwierdzono, że ekspozycja płodowych fibroblastów na BB-Cl-amidynę zwiększała ekspresję takich białek jak oksygenaza hemowa, izoformy dysmutazy ponadtlenkowej czy sulfotransferaza 1A1. Ekspresja tych białek kontrolowana jest przez czynnik transkrypcyjny Nrf2, zatem zasadne było wysunięcie hipotezy o aktywacji ścieżki Nrf2 pod wpływem inhibitora PADs.

Co niezwykle ciekawe i ważne, w pracach H2 i H3 Habilitantka analizowała metodami proteomicznymi profil białek ulegających cytrulinacji w makrofagach i fibroblastach. To niezwykle istotne dla lepszego scharakteryzowania tej wciąż niewystarczająco poznanej modyfikacji potranslacyjnej białek. Analiza bioinformatyczna pozwoliła określić rolę zidentyfikowanych białek ulegających cytrulinacji. Co istotne, wskazano także nowe miejsca cytrulinacji w kilku białkach strukturalnych.

W podsumowaniu można stwierdzić, że Habilitantce udało się zrealizować postawione cele badawcze, dzięki czemu powstał spójny cykl publikacji analizujących wpływ dwóch strategii terapeutycznych nakierowanych na ograniczenie rozwoju zmian miażdżycowych lub zwłóknieniowych poprzez oddziaływanie na dwa różne punkty uchwytu z wykorzystaniem drobnocząsteczkowych substancji – diminazenu (aktywator ACE2) i BB-Cl-amidyny (inhibitor PADs). Wszystkie prace wskazują na dużą konsekwencję badawczą i przemyślany proces dochodzenia do przekonujących wniosków. Oddziaływanie na komórki mikrośrodowiska może długofalowo przynieść znaczące korzyści terapeutyczne, co wymaga dalszej weryfikacji, ale ma potencjalne znaczenie aplikacyjne. Co ważne, Habilitantka dobitnie dowiodła, że jest doskonałym ekspertem z zakresu analiz proteomicznych, co przełożyło się na możliwość zaproponowania mechanizmów plejotropowego działania obu badanych substancji.

3. Ocena aktywności naukowej w więcej niż jednej instytucji naukowej

Dr Stachowicz w ramach programu Bekkera NAWA uzyskała finansowanie na odbycie rocznego stażu podoktorskiego zrealizowanego w latach 2019–2020 w zespole profesor Justyny Fert-Bober w Advanced Clinical Biosystems Research Institute, Smidt Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center w Los Angeles USA, którego rezultatem są m.in. dwie prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego, w których Kandydatka wykazuje podwójną afiliację.

Na wcześniejszych etapach kariery dr Stachowicz odbyła również dwa staże szkoleniowe: miesięczne szkolenie w laboratorium analiz proteomicznych w prestiżowym Barcelona Biomedical Research Institute w czerwcu 2015 roku; a także trzymiesięczny staż naukowy w grupie proteomicznej profesora Jacka Wiśniewskiego z Instytutu Biochemii Maxa Plancka w Martinsried w 2017 roku. Efektem tego ostatniego są trzy publikacje oryginalne.

Habilitantka spełnia zatem ustawowy wymóg realizowania badań naukowych w więcej niż jednej instytucji naukowej, a jej współpraca z ośrodkami zagranicznymi przyniosła wymierne efekty w postaci szeregu wspólnych publikacji, a także nawiązania długofalowej współpracy naukowej.

4. Ocena pozostałego dorobku naukowego

Na podstawie analizy bibliometrycznej przygotowanej przez pracowników Biblioteki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego można stwierdzić, że parametry naukometryczne dla całkowitego dorobku naukowego wskazują na zadowalającą aktywność naukową Habilitantki, która istotnie zwiększyła się po uzyskaniu stopnia doktora. Dr Stachowicz opublikowała łącznie 27 prac oryginalnych (sumaryczny IF=113,14), przy czym większość prac ukazała się po uzyskaniu stopnia doktora (18 artykułów spoza cyklu oraz 3 artykuły stanowiące osiągnięcie habilitacyjne). Habilitantka była pierwszym autorem w dwóch pracach oryginalnych przed uzyskaniem stopnia doktora, a także w sześciu artykułach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora (spoza osiągnięcia habilitacyjnego). Ponadto jest ona współautorką rozdziału w monografii poświęconego metodzie identyfikacji cytrulinowanych peptydów. Opublikowane artykuły cieszyły się zainteresowaniem innych badaczy, co odzwierciedla zadowalająca liczba cytowań (370 bez autocytowań według bazy Web of Science) oraz bardzo dobra wartość indeksu Hirscha równa 14.

Badania prowadzone poza osiągnięciem habilitacyjnym dotyczyły aktualnej i ważnej problematyki poszukiwania molekularnych mechanizmów powstawania miażdżycy, a także identyfikowania związków o potencjale przeciwmiażdżycowym. Drugim obszarem badawczym była analiza znaczenia dysfunkcji mitochondriów w chorobach metabolicznych o podłożu zapalnym (miażdżycy, niealkoholowe stłuszczenie wątroby), a także w depresji. Na uznanie zasługują także prace z obszaru proteomiki klinicznej poświęcone analizie składu białek skrzepu u pacjentów z zakrzepicą. Opublikowane prace wskazują na wszechstronność badawczą Habilitantki i umiejętne wykorzystanie doświadczenia z obszaru technik proteomicznych, co stanowi korzystną prognozę dalszego dobrego rozwoju naukowego.

Dr Stachowicz była wykonawcą projektu finansowanego przez MNiSW, a także kierownikiem dwóch projektów naukowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki: projektu Preludium realizowanego w latach 2011–2014, związanego z tematem pracy doktorskiej („Mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa (ALDH2) jako punkt uchwytu dla nowych leków przeciwmiażdżycowych”), a także projektu Sonata realizowanego w latach 2018–2023. Szczególne zainteresowanie budzą wyniki realizacji tego ostatniego, ponieważ wskazały, że związek AP39 będący donorem siarkowodoru redukuje poziom zmian miażdżycowych w modelu myszy pozbawionych ekspresji apoproteiny E poprzez zmniejszenie reakcji zapalnej oraz modulację polaryzacji makrofagów.

Ocena całościowego dorobku naukowego dr Stachowicz jest zdecydowanie pozytywna. Znalazło to odzwierciedlenie w uzyskaniu przez nią stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.

5. Ocena aktywności organizacyjnej, dydaktycznej i popularyzatorskiej

Habilitantka wykazała się zaangażowaniem w działalność organizacyjną, dydaktyczną i popularyzatorską. Dr Stachowicz realizowała obowiązki dydaktyczne prowadząc zajęcia z przedmiotu Farmakologia dla studentów Wydziału Lekarskiego UJ. Sprawowała także opiekę nad studenckimi praktykami wakacyjnymi. Dr Stachowicz może wykazać się także aktywnością popularyzatorską – uczestniczyła w organizacji Festiwalu Nauki w Collegium Medicum UJ, a także poprowadziła wykłady dla Towarzystwa Lekarskiego Krakowskiego (na temat znaczenia siarkowodoru w schorzeniach zapalnych i miażdżycy) oraz dla uczniów liceum (na temat zawodu naukowca).

Habilitantka wykonała szereg recenzji artykułów naukowych zgłoszonych do redakcji dobrych czasopism naukowych, takich jak m.in. *Antioxidants*, *Proteomics*, *Clinical Proteomics*, *Journal of Proteomics*, *European Journal of Pharmacology*, *PLoS One*, *Scientific Reports*, *PeerJ*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Free Radical Research*, *Molecules*, *Pharmacological Reports*, i inne. Jej aktywność wskazuje zatem na rozpoznawalność w środowisku jako eksperta w swojej dziedzinie.

6. Podsumowanie i wnioski końcowe

Pani Doktor Aneta Stachowicz jest uznanym ekspertem w zakresie analiz proteomicznych. Przedłożony do oceny dorobek naukowy stanowi istotny i oryginalny wkład w rozwój farmakologii układu krążenia, a wyniki badań Habilitantki mają wartość aplikacyjną, wskazując kierunki rozwoju nowych grup leków nakierowanych na modulację procesów różnicowania komórek mikrośrodowiska – makrofagów i fibroblastów. Osiągnięcie habilitacyjne jest spójnym tematycznie opracowaniem, świadczącym o metodologicznej dojrzałości Habilitantki. Całość dorobku naukowego wskazuje na wszechstronne opanowanie warsztatu badawczego, zarówno od strony tworzenia koncepcji i stawiania hipotez badawczych, poprzez adekwatne planowanie eksperymentów i ich przeprowadzenie w praktyce, z zachowaniem staranności i metodologicznej poprawności w szerokim zakresie technik analitycznych, zarówno w modelach *in vitro* oraz *in vivo*, po trafną i dogłębną analizę danych i formułowanie

adekwatnych wniosków z przeprowadzonych badań. Świadczy to o gotowości dr Stachowicz do prowadzenia samodzielnej aktywności naukowej.

Na tej podstawie można stwierdzić, że Pani Doktor Aneta Stachowicz spełnia podstawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, zgodnie z kryteriami określonymi w art. 219 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U.2023.742). Rekomenduję więc Radzie Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego poparcie wniosku dr Anety Stachowicz o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. n. farm. Jarosław Paluszczak