



Gdańsk, 15.05.2024

Prof. dr hab. Rafał Olszanecki
Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Recenzja osiągnięć naukowych w postępowaniu habilitacyjnym dr Anety Stachowicz

Habilitantka jest absolwentką studiów magisterskich na kierunku Biofizyka, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński które ukończyła jako magister biofizyki w czerwcu 2010. Tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja fosfoproteomu rdzenia kręgowego szczura przy użyciu metody IMAC i TiO₂-MOAC oraz spektrometrii mas” - napisana pod opieką prof. dr hab. Jerzego Silberringa.

W latach 2011 – 2015 uczestniczyła w interdyscyplinarnych studiach doktoranckich „Nauki molekularne dla medycyny” (MOL-MED) prowadzonych przez Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Wydział Lekarski Collegium Medicum, Wydział Chemii UJ i Instytut Farmakologii PAN. Stopień doktora nauk medycznych (biologia medyczna) uzyskała w październiku 2015, nadany przez Radę Wydziału Lekarskiego UJ CM. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania nad rolą mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) w patogenezie miażdżycy, depresji i neurodegeneracji” napisana pod opieką prof. dr hab. Rafała Olszaneckiego i prof. dr hab. Agnieszki Basty-Kaim

Od uzyskania stopnia doktora do chwili obecnej jest zatrudniona w Katedrze Farmakologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, początkowo jako pracownik naukowo – techniczny, a od października 2020 roku jako adiunkt badawczy. W latach 2019 – 2020 pracowała jako post-doc w Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center (Los Angeles, USA).

Dorobek naukowy Habilitantki obejmuje 25 prac oryginalnych oraz rozdział monografii. Łączny Impact Factor wynosi 113.14, liczba cytowań 403 (bez autocytowań: 370). Indeks Hirscha wynosi 14.

Ocena osiągnięcia naukowego

Jako swoje osiągnięcie naukowe stanowiące istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej Habilitantka przedstawiła cykl trzech oryginalnych prac opublikowanych w latach 2021-2023 pod tytułem: „Zastosowanie metod proteomicznych do poszukiwania molekularnych mechanizmów wpływających na fenotypowe różnicowanie komórek w chorobach układu krążenia o podłożu zapalnym”. Łączny Impact Factor (IF) wymienionych prac wynosi 18.808.



Habilitantka jest pierwszym autorem we wszystkich tych pracach. W jednej jest również korespondencyjnym. Z deklaracji współautorów wynika, że we wszystkich tych publikacjach wkład Habilitantki był wiodący.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia to:

Stachowicz Aneta, Wiśniewska Anna, Kuś Katarzyna, Białas Magdalena, Łomnicka Magdalena, Totoń-Żurańska Justyna, Kiepusza Anna, Stachyra Kamila, Suski Maciej, Bujak-Giżycka Beata, Jawień Jacek, Olszanecki Rafał. Diminazene Acetate Stabilizes Atherosclerotic Plaque and Attenuates Hepatic Steatosis in apoE-Knockout Mice by Influencing Macrophages Polarization and Taurine Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2021: Vol. 22, nr 11, id. art. 5861.

Stachowicz Aneta, Pandey Rakhi, Sundararaman Niveda, Venkatraman Vidya, Van Eyk Jennifer E., Fert-Bober Justyna. Protein arginine deiminase 2 (PAD2) modulates the polarization of THP-1 macrophages to the anti-inflammatory M2 phenotype. *Journal of Inflammation* 2022: Vol. 19, id. art. 20.

Stachowicz Aneta, Sadiq Alia, Walker Brian, Sundararaman Niveda, Fert-Bober Justyna. Treatment of human cardiac fibroblasts with the protein arginine deiminase inhibitor BB-CI-amidine activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023: Volume 167, 115443

Celem badań przedstawionych w osiągnięciu habilitacyjnym było poszukiwanie molekularnych mechanizmów wpływających na fenotypowe różnicowanie komórek w chorobach układu krążenia o podłożu zapalnym przy zastosowaniu nowoczesnych metod proteomicznych. W szczególności skupiono się na poszukiwaniu molekularnych mechanizmów polaryzacji makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 i przeciwzapalnego M2 w miażdżycy oraz różnicowania fibroblastów serca do miofibroblastów.

W badaniach zastosowano metody proteomiczne (iTRAQ oraz DIA-MS, Western blot), standardowe metody biochemiczne, histologiczne, immunohistochemiczne oraz techniki biologii molekularnej (wyciszenie genu za pomocą siRNA, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)).

Główne wyniki i wnioski płynące z tych badań to:

Aktywator enzymu ACE2 – diminazen zmienił polaryzację makrofagów do fenotypu przeciwzapalnego M2 w blaszkach miażdżycowych myszy apoE^{-/-}, co razem ze zmniejszeniem zawartości makrofagów oraz wzrostem zawartości mięśni gładkich przyczyniło się do stabilizacji blaszki miażdżycowej. Diminazen zmniejszył również stłuszczenie wątroby, co było związane ze spadkiem zawartości trójglicerydów oraz enzymu ALT w wątrobie, ze wzrostem cholesterolu HDL w osoczu oraz ze wzrostem ekspresji CSAD i



poziomu tauryny w wątrobie myszy apoE^{-/-}. Korzystne działanie diminazenu wpływające na zmianę polaryzacji makrofagów w blaszce miażdżycowej oraz zmniejszenie stłuszczenia wątroby mogło być związane ze wzrostem ekspresji enzymu CSAD, który jest odpowiedzialny za syntezę tauryny.

Zahamowanie aktywności deiminaz białkowo-argininowych (PADs) za pomocą inhibitora BB-Cl-amidyny doprowadziło do zmniejszenia polaryzacji makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 oraz zwiększenia polaryzacji do fenotypu przeciwzapalnego M2 w makrofagach THP-1, co może mieć kluczowe znaczenie w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych wpływających na przeprogramowanie makrofagów. Wyciszenie PAD2 za pomocą siRNA w makrofagach THP-1 doprowadziło do zmiany polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu przeciwzapalnego M2, co może wskazywać na ważną rolę PAD2 w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację polaryzacji makrofagów.

Zastosowanie nowoczesnych metod proteomicznych pozwoliło na identyfikację nowych miejsc cytrulinacji w makrofagach THP-1. Wykryte miejsca cytrulinacji znajdowały się na białkach biorących udział w sygnalizacji przez interleukiny, degranulacji neutrofilii, programowej śmierci komórki, obróbce DNA i RNA, degradacji w proteasomach, aktywacji płytek krwi oraz sygnalizacji przez VEGF. Zahamowanie PAD za pomocą inhibitora BB-Cl-amidyny zmniejszyło aktywację fibroblastów do miofibroblastów, co związane było z obniżeniem ekspresji markera miofibroblastów COL1A1 oraz ze wzrostem degradacji kolagenu. BB-Cl-amidyna aktywowała szlak sygnalizacyjny Nrf2/HO-1 w fibroblastach, co ma kluczowe znaczenie dla ochrony komórek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i może wywoływać korzystny efekt w przeciwdziałaniu różnicowaniu fibroblastów do miofibroblastów. Nowoczesna proteomika pozwoliła również na identyfikację nowych miejsc cytrulinacji w fibroblastach i miofibroblastach. Wykryte miejsca cytrulinacji znajdowały się na białkach biorących udział w degranulacji neutrofilii, obróbce DNA, procesach translacji, degradacji w proteasomach, odpowiedzi komórkowej na stres, sygnalizacji przez IL-4 i IL-13, obróbce białek w siateczce śródplazmatycznej i sygnalizacji przez VEGF.

Badania te są spójne tematycznie i stanowią znaczący wkład w rozwój metodyk badawczych oraz dostarczają nowych danych dotyczących mechanizmów zapalnych i procesów patologicznego włóknienia oraz ich roli w procesie miażdżycowym, szczególnie w destabilizacji blaszki miażdżycowej. Badania te dostarczyły przesłanek dla nowych celów terapeutycznych.

Ocena pozostałej aktywności naukowej

Działalność naukowa nie uwzględniona w habilitacyjnym osiągnięciu naukowym jest przede wszystkim związana z zastosowaniem analiz proteomicznych w badaniach patologii sercowo-naczyniowych i zaburzeń neuropsychiatrycznych. Wśród tego dorobku jest wiele prac w których habilitantka jest pierwszym autorem. W szczególności badania te dotyczyły roli mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej w modelu zwierzęcym depresji, aspektów



metodycznych analiz proteomicznych i nowych danych u pacjentów z zakrzepicą żylną i zespołem antyfosfolipidowym, zmian proteomu wątroby myszy apoE/eNOS-DKO oraz wpływem trehalozy na miażdżycę i stłuszczenie wątroby u myszy Apo E KO. Habilitantka angażuje swe doświadczenie w zakresie analiz proteomicznych wspierając pracę innych zespołów.

Habilitantka wielokrotnie przebywała na zagranicznych stażach naukowych. W czerwcu 2015 odbyła miesięczny pobyt szkoleniowy w laboratorium proteomicznym CSIC/UAB Proteomics Facility (Barcelona Biomedical Research Institute (IIBB-CSIC) / Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Hiszpania). Od marca do maja 2017 przebywała w laboratorium proteomicznym Prof. Matthiasa Manna (Department of Proteomics and Signal Transduction, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Niemcy). Od września 2019 do września 2020 przebywała na stażu podoktorski w grupie badawczej Prof. Justyny Fert-Bober w laboratorium proteomicznym Prof. Jennifer Van Eyk (Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA).

Habilitantka kierowała grantem Preludium Narodowego Centrum Nauki: „Mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa (ALDH2) jako punkt uchwytu dla nowych leków przeciwmiażdżycowych” (PRELUDIUM NCN N/NZ4/01145) w latach 2011 – 2014. Po doktoracie w latach 2018 – 2023 kierowała grantem Sonata Narodowego Centrum Nauki: „Wpływ siarkowodoru (H₂S) wytwarzanego w mitochondriach na mechanizmy związane z przeprogramowaniem makrofagów – rola w miażdżycy i niealkoholowym stłuszczeniu wątroby” (SONATA NCN 2017/26/D/NZ4/00480). Była również wykonawcą w innych projektach.

Habilitantka prowadziła zajęcia z przedmiotu „Farmakologia” dla studentów Wydziału Lekarskiego UJ CM w latach 2012-2015, opiekowała się praktykami wakacyjnymi studentów, uczestniczyła w organizacji i przeprowadzeniu Festiwalu Nauki w UJ CM, prowadziła prestiżowe wykłady popularyzujące naukę i należy do Human Proteome Organization (HUPO).

Habilitantka uzyskała w związku ze swoją działalnością naukową liczne nagrody i stypendia, w tym stypendium miasta Krakowa dla szczególnie uzdolnionych studentów oraz uczestników studiów doktoranckich krakowskich uczelni wyższych, Komisja Stypendialna Miasta Krakowa i Prezydent Miasta Krakowa, 8 marca 2011, Stypendium Doctus – Małopolski Fundusz Stypendialny dla doktorantów (2012-2015), Doktor nauk medycznych summa cum laudae (2015), Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) – stypendium dla młodych, utalentowanych naukowców (2016-2017), Stypendium Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) na staż podoktorski w USA (Program Bekkera) (2018) Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych, młodych naukowców (2019)



Podsumowanie i wnioski końcowe

Habilitantka jest wysokiej klasy ekspertką w zakresie nowoczesnych metod proteomicznych i ich zastosowania w badaniach zarówno eksperymentalnych jak i klinicznych. Zdobyła znaczące doświadczenie zagraniczne i z sukcesem uzyskiwała środki na prowadzenie swych badan naukowych. Osiągnięcia te spełniają kryteria stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego (zgodnie z art. 219 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. – Dz. U. z 2021 r. poz 478 z późn. Zm.). Wnoszę niniejszym do Komisji Habilitacyjnej o podjęcie uchwały o nadanie dr Anecie Stachowicz przez Radę Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego stopnia doktora habilitowanego.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński