Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków, 7 maja 2019 roku

Dr hab. Katarzyna Starowicz-Bubak, prof. IF PAN
Kierownik Zakładu Neurochemii
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie

Recenzja dorobku naukowego dr Małgorzaty Pierzchalskiej w związku z postępowaniem habilitacyjnym

W związku z powołaniem mnie przez Centralną Komisję do Spraw Stopni i Tytułów na recenzenta dorobku dr Małgorzaty Pierzchalskiej zapoznałam się z dorobkiem naukowym Kandydatki jak również z przedstawioną w autoreferacie działalnością naukowo-badawczą, dydaktyczną i organizacyjną i niniejszym przedkładam Wysokiej Radzie moją recenzję.

Uwagi wprowadzające

Dr Małgorzata Pierzchalska ukończyła studia i uzyskała stopień magistra na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w 1990 roku. Na podstawie rozprawy „Badania nad wpływem środków znieczulających miejscowo na fibroblasty skóry ludzkiej w hodowli" uzyskała stopień doktora nauk biologicznych na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ w Krakowie w roku 1997.
Po doktoracie Małgorzata Pierzchalska była starszym specjalistą naukowo-technicznym w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ CM, a następnie od grudnia 2006 roku zajmuje stanowisko adiunkta na Wydziale Technologii Żywności w Katedrze Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Z tej krótkiej charakterystyki widać, że dr Małgorzata Pierzchalska należy do grona naukowców o przyrodniczym wykształceniu, realizującym badania naukowe w naukach biologicznych.

Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

Dr Małgorzata Pierzchalska jest współautorem 30 publikacji naukowych z czego 24 ukazało się po doktoracie. Sumaryczny Impact Factor wszystkich prac Autorki, jak wynika z dostarczonej dokumentacji, wynosi 62.763 (listopad 2018), liczba cytowań wg. bazy *Web of Science – Core Collection* (marzec 2019) wynosi 556, index Hirscha wynosi 18 (marzec 2019). Przedstawione dane bibliometryczne nie odbiegają od średniej i upoważniają do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

Uwagi wstępne dotyczące rozprawy habilitacyjnej, zatytułowanej „Organoidy jelitowe otrzymane z zarodków kurzych. Charakterystyka nowego modelu i jego wykorzystanie do badania wpływu probiotyków oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na śluzówkę przewodu pokarmowego".

Zgodnie z wymogami aktualnie obowiązującej ustawy, Kandydatka zaprezentował dorobek w postaci osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego oraz pozostały dorobek naukowy i osiągnięcia na polu organizacyjnym i dydaktycznym. Jako wyodrębnione z całości dorobku naukowego osiągnięcie naukowe Kandydatka zaprezentowała cykl 6 spójnych tematycznie publikacji dotyczących opracowania metody hodowli trójwymiarowej komórek nabłonka jelitowego kury oraz porównanie modelu kurzych organoidów jelitowych z odpowiadającymi im modelami ssaczymi. W ramach prezentowanego osiągnięcia, pięć publikacji to prace oryginalne a jedna – praca przeglądowa. Spośród pięciu prac oryginalnych, Kandydatka jest pierwszym autorem w czterech z nich, a w pracy przeglądowej jest jedynym z dwóch autorów. W przesłanej mi do recenzji dokumentacji informacja dotycząca parametrów bibliometrycznych przedkładanego osiągnięcia naukowego i dorobku była podana w postaci syntetycznego zestawienia w tabeli (uaktualnionego po wyznaczeniu przez Centralną Komisję ds. Tytułów i Stopni Naukowych recenzentów dla niniejszej rozprawy). Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały opublikowane w czasopismach o niezłej, lecz umiarkowanej renomie, przy czym wszystkie prace prezentowane w ramach osiągnięcia zostały opublikowane w periodykach z listy filadelfijskiej.

Jako recenzent dorobku habilitacyjnego, chcę wyartykułować kilka uwag odnośnie tego dorobku, a w szczególności w odniesieniu do roli dr Pierzchalskiej w realizowanych projektach, która określona jest w załączonych oświadczeniach. Podstawowym wymogiem stawianym kandydatowi do stopnia naukowego doktora habilitowanego jest wykazanie się kreatywnością i samodzielnością w rozwiązywaniu ważkich zagadnień naukowych. Na podstawie oświadczeń określających udział Kandydatki w poszczególnych publikacjach, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, warunek ten w postawieniu poszczególnych zagadnień i wykrystalizowaniu koncepcji podjętych badań jest spełniony. W pracach, w których kandydatka jest autorem wiodącym tj. PI-PIII i pracy przeglądowej PVI kształtuje się on między 70 a 75%, w pracy PV udział szacowany jest aż na 90%; natomiast w publikacji PIV, gdzie Kandydatka jest współautorem, wkład w pracę wynosi 30%. Załączone oświadczenia współautorów są zgodne z procentowym udziałem własnym oszacowanym przez dr Pierzchalską i nie pozostawiają wątpliwości, że główne osiągniecia naukowe będące treścią ocenianej rozprawy można przypisać Habilitantce.

Szczegółowa ocena rozprawy habilitacyjnej

Zagadnienia wchodzące w skład rozprawy dotyczą, ogólnie rzecz biorąc, badań nad opracowaniem modelu śluzówki jelitowej kur *in vitro.*

Praca otwierająca habilitację Pierzchalska i wsp., 2012 (pozycja pierwsza w spisie publikacji oznaczona symbolem [PI]) zawiera omówienie wydajnej izolacji komórek nabłonka poprzez inkubację fragmentów jelita pochodzącego z zarodków kurzych między 18. a 20. dniem rozwoju w obecności zbuforowanych roztworów zawierających chelator jonów wapnia w różnych czasach inkubacji (0,5–2 godziny). Celem pracy było też ustalenie właściwego podłoża do wysiania otrzymanych fragmentów nabłonka oraz przetestowania składników pożywek umożliwiających proliferację komórek nabłonkowych poprzez jak najdłuższy czas po izolacji. Badania te były

realizowane w ramach projektu badawczego MNiSW nr N302 130834. Habilitantka z uwagą obserwowała prowadzone na świecie badania w tym zakresie i z powodzeniem je wdrażała, podnosząc konkurencyjność swoich badań i opisując metodę hodowli organoidów pochodzących z jelitowego nabłonka zarodków kurzych. W pracy [PII] (Pierzchalska i wsp., 2016) zaproponowano metodę zakładania i prowadzenia hodowli organoidów pochodzących z kurzych zarodków i z jelita dorosłych kur wraz z dokładnym opisem otrzymanych w warstwie matriżelu trójwymiarowych struktur złożonych z komórek. Można przypuszczać, że miofibroblasty wraz z komórkami nabłonkowymi stanowią spójną jednostkę strukturalną, Habilitantka uwzględniała więc w swojej pracy obecność komórek o charakterze miofibroblastów w hodowli organoidów. Opisała również wyniki ilościowe pochodzące z porównania pod względem morfologicznym hodowli utrzymywanych w pożywkach o różnym składzie (np. z dodatkiem kurzej surowicy w stężeniu nie przekraczającym 1% sprzyjającemu proliferacji komórek nabłonkowych i wzrostowi organoidów, w przeciwieństwie do płodowej surowicy cielęcej, która w podobnym stężeniu hamuje wzrost organoidów).

W pracy [PIII] (Pierzchalska i wsp., 2017) podjęto próbę oceny wpływ bakterii probiotycznych oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych jelita cienkiego. Badania te były realizowane w latach 2013-2017 w ramach projektu badawczego NCN 2013/09/B/NZ9/00285. Badania prowadzono w modelu organotypowej hodowli trójwymiarowej, pochodzącej z zarodków kurzych. Celem podjętych badań było pokazanie, że wybrane ligandy niektórych receptorów TLR oraz probiotyczne pałeczki Lactobacillus acidophilus LA5, po dodaniu do hodowli, wpływają na wzrost i różnicowanie komórek w obrębie organoidów. Wykazano, że jeśli do hodowli organoidów jelitowych kury dodano składniki bakteryjnej ściany lub całe żywe bakterie, twory takie szybciej rosną, w ich obrębie dzieli się więcej komórek, a produkcja prostaglandyn (PGE_2 i PGD_2) w nadsączach jest zwiększona. Pojawienie się w tkance prostanoidów wiąże się przeważnie z wystąpieniem stanu zapalnego, jednak jak sugeruje Habilitantka, mogą one także stymulować komórki macierzyste nabłonka jelitowego do podziałów.

W pracy [PIV] (Panek i wsp., 2018) opracowano i zastosowano metodę innego podejścia do hodowli organoidów. Organoidy uzyskano zawieszając kroplę zawierającą nabłonek zarodkowych jelit w specjalnych wąskich kanalikach wielodołkowej płytki hodowlanej, gdzie siła ciężkości powoduje gromadzenie się wszystkich komórek w jednym miejscu, na dnie kropli. W tym przypadku jednak nie zaobserwowano obecności licznych miofibroblastów w tworzących się skomplikowanych strukturach złożonych z połączonych organoidów, a przydatność opisanej nowej metody musi jeszcze zostać zweryfikowana.

W pracy [PV] (Pierzchalska i wsp., 2018) zbadano cechę organoidów jelitowych często pomijaną przez badaczy, czyli ich dynamikę, zdolność do ruchu i migracji, ze szczególnym uwzględnieniem migracji kierunkowej. W tym celu zastosowano metodę poklatkowej rejestracji obrazów i ich cyfrowej analizy. Niezmiernie ciekawym wynikiem tej części badań jest fakt, że duża część organoidów aktywnie się porusza. Organoidy o morfologii zbliżonej do sfer intensywnie rotują, a organoidy o kształtach bardziej nieregularnych są zdolne do pokonywania około 300 mikrometrów na dzień w warstwie matriżelu. Co więcej, Habilitantka wykazała również, że w czasie ruchu organoidy zmieniają swój kształt na bardziej wydłużony. Na skutek wzrostu i przemieszczania poprzez żel złożony z białek macierzy zewnątrzkomórkowej sąsiadujące ze sobą organoidy mogą ulegać fuzji. Innym ważnym wynikiem tych badań było wykazanie mechanizmu zaangażowanego

w opisane wyżej zjawisko, tj. wykazanie roli kinaz białkowych związanych z Rho w aktywność ruchową organoidów. Wynik ten jest istotnym wskazaniem dla badaczy zajmujących się mechanobiologią komórkową, że dynamiczne procesy fuzji i ruchu nie powinny być pomijane w modelowych badaniach fizjologii śluzówki jelit.
Praca [PVI] (Pierzchalska i Grabacka, 2016) ma zbliżoną tematykę i jest to praca przeglądowa, omawiająca wpływ bioaktywnych składników żywności na odpowiedź komórek na stymulację TLR przez ligandy pochodzące z mitochondriów. To zagadnienie stanowi odzwierciedlenie dalszych zainteresowań i planów badawczych Habilitantki.
Moim zdaniem praca [PII] oraz praca [PV] opisują najcenniejsze osiągniecia naukowe recenzowanej Rozprawy. Opisane osiągniecia badawcze wchodzące w skład Rozprawy stanowią istotny i nowatorski wkład do dziedziny nauki, którą zajmuje się Habilitantka. Jest to powodem mojej ogólnie pozytywnej opinii o recenzowanej pracy.

Osiągniecia naukowo-badawcze nie będące treścią rozprawy
Osiągnięcia badawcze dr Pierzchalskiej wykraczają poza główną tematykę dzieła habilitacyjnego i wiążą się z różnorodnymi zagadnieniami naukowymi m.in.:

- mechanobiologią komórek i tkanek, ruchem komórek i strukturą cytoszkieletu oraz metodami pierwotnych hodowli komórek (udokumentowane 3 publikacjami naukowymi *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30(3), 107-11; *Cell. Biol. Int.*, 18(8): 791-6.; *Eur. J. Pharmacol.*, 475(1-3): 1-10 oraz badaniami w ramach grantu promotorskiego KBN zwieńczonymi publikacją *Eur. J. Pharmacol.*, 358(3): 235-44.
- biologicznymi podstawami astmy (udokumentowane pięcioma publikacjami naukowymi, w trzech z pięciu z nich z tego okresu Habilitantka była głównym pomysłodawcą, wykonawcą i pierwszym autorem, łączny IF prac wynosi 14,244, mnogość cytowań pozwala wnioskować, że zostały one docenione przez środowisko badaczy zainteresowanych patogenezą astmy oskrzelowej).
- badaniami nad mechanizmem przejścia fenotypowego fibroblasty – miofibroblasty w przebiegu astmy oskrzelowej oraz innych chorób zwłóknieniowych. Praca tego okresu obejmuje 4 współautorskie publikacje (autoreferat strona 23)

Po rozpoczęciu pracy na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie na Wydziale Technologii Żywności w Katedrze Biotechnologii Żywności, Habilitantka podjęła wraz z dr hab. Grabacką zadania zmierzające do zwiększenia potencjału badawczego jednostki tj. organizacji pracowni hodowli komórkowej i tkankowej oraz pracowni mikroskopowej. Wyposażenie pracowni w mikroskop fluorescencyjny umożliwiło stosowanie zaawansowanych technik mikroskopii i analizy obrazu nie tylko dla grupy badawczej, w której pracuje Habilitantka, ale także dla innych pracowników Wydziału.

Habilitantka wykazuje zainteresowania badawcze wykraczające poza swoją specjalizację i chętnie podejmuje współpracę naukową np. dotyczącą badań nad biodostępnością fosforanów inozytolu uwalnianych w chlebie z kwasu fitynowego przez dodane do niego enzymy – fitazy, wykorzystując przy tym model nabłonka jelita cienkiego złożonego ze zróżnicowanych komórek Caco-2 (powstały dwie publikacje naukowe wymienione w autoreferacie na str. 24). W ramach międzyuczelnianej

współpracy Habilitantka brała też udział w badaniach dotyczących enzymatycznej biokonwersji fitynianów z żywności i pasz oraz dotyczących biologicznej roli inozytolu i jego fosforanów (powstały dwie kolejne publikacje naukowe wymienione w autoreferacie na str. 24). Ponadto dr Pierzchalska brała udział w badaniach dotyczących wpływu ligandów receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów alfa na fizjologię i metabolizm komórek nowotworowych. Wyniki badań prowadzonych we współpracy międzynarodowej są opublikowane w czasopismach *Curr. Pharm. Biotechnol, Int. J. Mol. Sci oraz Front. Endocrinol* (wymienione w autoreferacie na str. 24 i 25).

Działalność dydaktyczna, popularyzatorska i organizacyjna

Działalność dydaktyczna Habilitantki nie wzbudza zastrzeżeń. Dr Pierzchalska sprawowała opiekę naukową nad dwiema doktorantkami, była też promotorem wielu prac magisterskich (wypromowani magistrzy z Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w latach 2006-2017: 9 osób; wypromowani magistrzy z Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego w latach 2006-2017: 9 osób) oraz opiekunem naukowym studentów wykonujących prace inżynierskie (łącznie 24 osoby). Ponadto, Habilitantka prowadziła liczne szkolenia nowych pracowników, magistrantów i doktorantów w zakresie metod badawczych. Dr Pierzchalska prowadziła również liczne kursy naukowo-szkoleniowe w tym kurs szkoleniowy dla pracowników naukowych Politechniki Federalnej w Bauchi w Nigerii. Powyższe podkreśla istotny aspekt działalności dydaktycznej Habilitantki, którym jest uczenie nowych pracowników, doktorantów, magistrantów i studentów. Dr Pierzchalska może się również wykazać znacznymi osiągnieciami na polu popularyzacji nauki (współpraca z lokalna gazetą „Gazeta Krakowska" oraz tygodnikiem „Polityka"). Ponadto prowadziła wykłady w ramach cyklicznych imprez np. Małopolskiej Nocy Naukowców czy Uniwersytetu dla Młodzieży.

W czasie swojej pracy naukowej odbyła dwa krótkoterminowe staże zagraniczne (grudzień 2000 i listopad-grudzień 2001). Dr Pierzchalska nie odbyła długoterminowego stażu naukowego za granicą, co jest niezgodne z rozpowszechnionym schematem kariery naukowca i przeciwstawia się, często bezwzględnie narzucanemu, obowiązkowi mobilności. Nie stanowi to negatywnego elementu w karierze Habilitantki, ponieważ pozostając w Polsce, w swoim macierzystym ośrodku, wykazała się znaczącą twórczością naukową.

Habilitantka uczestniczyła w prowadzeniu badań w 10 projektach naukowych oraz współpracowała z innymi zespołami badawczymi m.in. z II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ CM i Zakładu Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. W trzech projektach pełniła rolę kierownika. Dr Pierzchalska wykazała się sprawnością w zarządzaniu projektami badawczymi, co bardzo dobrze rokuje co do jej przyszłej kariery jako samodzielnego pracownika naukowego. Zauważam również uzyskanie nagród, wyróżnień i stypendiów naukowych, choć liczebnie ani jakościowo nie są one imponujące (zwłaszcza biorąc pod uwagę czas, jaki upłynął od uzyskania stopnia doktora).

Habilitantka była także recenzentem kilku publikacji w czasopismach międzynarodowych. Dr Małgorzata Pierzchalska nie jest członkiem żadnego międzynarodowego ani krajowego towarzystwa naukowego.

Podsumowanie

Reasumując, uważam, że dr Małgorzata Pierzchalska jest niewątpliwie ekspertem w dziedzinie opracowania modelu śluzówki jelitowej kur *in vitro*. Opracowanie i dogłębna charakterystyka modelu kurzych „minijelit" umożliwia jego zastosowanie w przyszłych projektach badawczych dotyczących immunologii śluzówki jelitowej, roli receptorów Toll-podobnych w homeostazie nabłonka oraz stosowania bakterii probiotycznych jako elementu profilaktyki i terapii chorób o podłożu zapalnym. Jej rozprawa habilitacyjna zawiera szereg nowatorskich i samodzielnie otrzymanych rezultatów o dużym znaczeniu naukowym i praktycznym. Pomimo kilku krytycznych uwag, biorąc pod uwagę osiągniecia naukowe będące treścią rozprawy oraz aktywność w zakresie publikacyjnym, organizacyjnym, dydaktycznym i popularyzatorskim, stwierdzam, że dorobek naukowy przedstawiony przez dr Małgorzatę Pierzchalską spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego określone Ustawą z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r., w sprawie kryteriów oceny osiągnieć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz.U. Nr 196, poz. 1165). W związku z powyższym popieram wniosek o nadanie dr Małgorzacie Pierzchalskiej stopnia doktora habilitowanego dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biologia.