

dr hab. Anna Herman-Antosiewicz, prof. UG
Katedra Biologii i Genetyki Medycznej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 04.08.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej
pani mgr Justyny Marty Wierzbickiej, pt:
„Modulacja ekspresji elementów skórno-przysadka-nadnercza
(ang. HPA) w procesie różnicowania keranocytów – wpływ witaminy D”

Pomimo, że od odkrycia witaminy D minęło prawie sto lat, doniesienia o jej rozlicznych aktywnościach oraz nowo odkrywanych przemianach metabolicznych, wciąż zaskakują. Wiadomo od dawna, że u ludzi jej synteza zachodzi dzięki przemianie 7-dehydrocholesterolu pod wpływem UVB w keranocytach warstwy podstawnej skóry, co zapoczątkowuje kolejne reakcje prowadzące do powstania jej aktywnej formy, kalcytriolu. Hormon ten ma plejotropowe działanie na organizm człowieka. Co ważne, oddziałuje również na komórki skóry, m.in. regulując ich podziały i różnicowanie. Ostatnio zidentyfikowano kolejne metabolity tej witaminy, a ich aktywność nie jest w pełni znana. Innym ważnym czynnikiem wpływającym na funkcjonowanie komórek skóry jest szlak produkcji neuropeptydów, który jest skórnym odpowiednikiem centralnego systemu podwzgórze-przysadka-nadnercza (sHPA).

Zarówno witamina D3 jak i szlak sHPA są istotne dla prawidłowego funkcjonowania skóry, jednak wiedza o ich wzajemnych powiązaniach jest znikoma, choć może mieć znaczenie praktyczne w kontroli różnych patologicznych stanów skóry. Zatem badania zmierzające do poznania roli szlaku sHPA w skórze i jego powiązań z innymi czynnikami regulującymi fizjologię tego organu, jak witamina D3 czy wapń, są jak najbardziej uzasadnione. Zostały one

podjęte w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Została ona wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem pana prof. Michała Żmijewskiego, który od lat prowadzi badania nad metabolizmem i aktywnością witaminy D. W przedstawionej do recenzji rozprawie wyraźnie widać, że Doktorantka wszechstronnie skorzystała z potencjału technicznych i aparaturowego Jednostki, a przede wszystkim z wiedzy i doświadczenia naukowego Promotora rozprawy.

Celem pracy doktorskiej pani mgr Justyny Wierzbickiej było zbadanie dynamiki zmian w poziomie ekspresji genów, których produkty składają się na oś sHPA, w zależności od stopnia zróżnicowania komórek naskórka oraz w odpowiedzi na witaminę D3 i jej analogi. Rozprawa została przedstawiona w postaci zbioru czterech wieloautorskich publikacji wraz ze streszczeniem oraz wprowadzeniem do tematyki rozprawy w języku polskim i angielskim. Jest to zgodne z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki, zgodnie z którą rozprawę doktorską może stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, odpowiadający warunkom określonym w ustawie. Lektura oświadczeń poszczególnych współautorów prac o udziale w ich powstaniu, pozwala stwierdzić, że rozprawa spełnia wymogi formalne zawarte w ustawie.

Na rozprawę doktorską pani mgr Wierzbickiej składają się dwie prace przeglądowe i dwie prace eksperymentalne. Obie prace przeglądowe zostały opublikowane w *Acta Biochimica Polonica* (IF 1,153), natomiast prace doświadczalne - w *Journal of Cell Physiology* (IF 4,155) oraz *Molecular and Cellular Endocrinology* (IF 3,859). Wartości i zasięg naukowy tych czasopism, niezależnie od ich punktacji, są niewątpliwe. W trzech z tych publikacji pani mgr Wierzbicka jest pierwszym autorem, a w jednej z prac przeglądowych - jest drugim w kolejności autorem. W obydwóch pracach eksperymentalnych Doktorantka wykonała przeważającą część eksperymentów, w tym - analizy ekspresji genów (ilościowy RT-PCR, immunoblotting) oraz mikroskopowych (immunocytochemia i immunohistochemia), analizowała także uzyskane wyniki oraz we wszystkich - sporządziła ryciny i wraz z Promotorem rozprawy przygotowała manuskrypty prac. Wskazuje to jednoznacznie na wiodący udział Doktorantki w powstaniu tych publikacji. Przedstawienie rozprawy w postaci zbioru publikacji oznacza także, iż prezentowane

w niej wyniki przeszły już ścisły i krytyczny proces recenzji, a zaakceptowanie ich do druku w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym świadczy o ich znaczeniu naukowym.

Prace przeglądowe w szerokim zakresie opisują historię badań oraz to, co dziś wiadome jest o aktywności witaminy D (The renaissance of vitamin D” z 2014 r. w *Acta Biochim Pol*), a w szczególności jej rolę w funkcjonowaniu skóry (praca pt: „Vitamin D in the skin physiology and pathology” z 2016 r. w *Acta Biochim Pol*). Publikacje te bardzo dobrze wprowadzają w tematykę dalszych badań Doktorantki, ale przede wszystkim są wartościowymi źródłami informacji o fizjologicznych funkcjach i molekularnym mechanizmie działania witaminy D.

Kolejne prace ściśle dotyczą tematu rozprawy doktorskiej, tj. ekspresji elementów sHPA w różnych modelach doświadczalnych. W pracy z 2017 r. („Differentiation of keratinocytes modulates skin HPA analog” z *J Cell Physiol*) Doktorantka zbadła poziom ekspresji genów neuropeptydów i ich receptorów na poziomie mRNA oraz białka w zależności od stopnia zróżnicowania komórek naskórka (w sumie 8 genów), wykorzystując biopsje skóry ludzkiej (naskórek i skóra właściwa) oraz hodowle keranocytów, których proces różnicowania był spowodowany kontaktowym zahamowaniem wzrostu lub ekspozycją na jony wapnia. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że produkcja elementów sHPA jest zależna od stopnia zróżnicowania komórek naskórka. W pracy został też zaproponowany model pokazujący, w których warstwach naskórka produkowane są i działają neuropeptydy i ich receptory. Doktorantka obserwowała pewne rozbieżności między wynikami *in vitro* i *in vivo*. Dla przykładu, w biopsji skóry, kortykoliberyna (CRF) była obecna głównie w warstwie podstawnej, natomiast w hodowli *in vitro* - w komórkach nieproliferujących i różnicujących się. W pracy postawiono hipotezę, że w naskórku białko to jest produkowane i uwalniane przez komórki dzielące się, natomiast oddziałuje na komórki zróżnicowane, a w hodowli *in vitro* komórki akumulują ten neurohormon, nawet gdy różnicują. Czy wiadomo jest, jaki czynnik jest potrzebny, aby CRF był uwalniany przez komórki, które go produkują? Ciekawe jest również, że w zależności od czynnika stymulującego różnicowanie obserwuje się różną odpowiedź na poziomie ekspresji genów (np. UNC2, GR).

Bardzo interesujące dane zostały uzyskane i przedstawione w drugiej publikacji („Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human eidermal keratinocytes” z 2016 r. w *Mol Cell Endocrinol*), w której pokazano, że aktywna forma witaminy D₃ (1,25(OH)₂D₃, sama lub w połączeniu z

jonami wapnia) oraz jej niedawno odkryte analogi, 20(OH)D₃ i 21(OH)D₃ modulują poziomy elementów sHPA (zarówno hormonów jak i receptorów, szczególnie receptorów melanokortyn) w keranocytach linii HPEKp. Zbadano tu również, jak badane związki wpływają na żywotność tych komórek i poziom mRNA dla markerów różnicowania oraz enzymów biorących udział w metabolizmie witaminy D. Co ciekawe, o ile w większości analiz aktywność 20(OH)D₃ była zbliżona do aktywności 1,25(OH)₂D₃, to 21(OH)D₃ wyraźnie się różniła; związek ten również nie powodował różnicowania keranocytów. Co zatem ten związek aktywuje w komórkach, że obserwuje się zahamowanie ich żywotności? Jak można by było eksperymentalnie zweryfikować, czy promieniowanie UVB wpływa na sHPA bezpośrednio czy pośrednio - przez stymulację produkcji witaminy D₃ lub jej analogów?

Wyniki prezentowane w recenzowanej pracy są ważne, bowiem zależność między produkcją elementów sHPA a stopniem różnicowania komórek oraz ekspozycją na formy witaminy D₃ czy wapń, które też regulują proces różnicowania komórek naskórka, może wskazywać na udział tych elementów w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu tego organu. Wyniki te mają zatem potencjał aplikacyjny. Stanowią również punkt wyjścia do dalszych badań.

Podsumowując, analiza uzyskanych przez Doktorantkę wyników oraz ocena indywidualnego Jej wkładu w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, pozwala mi stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13. ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki. Zgodnie z ustawą przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z prośbą o dopuszczenie pani mgr Justyny Wierzbickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na dużą wartość poznawczą, jaką przedstawiają dobrze udokumentowane wyniki tej pracy, a także ich potencjał aplikacyjny, wnoszę o jej wyróżnienie.

Anna Kiermin - Antkiewicz