



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII BIAŁEK
ul. Joliot-Curie 14a, pok. 3.30
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 29 29
fax +48 71 375 76 61

Wrocław, 26 lipca 2017

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ AUTORSTWA MGR JUSTYNY WIERZBICKIEJ, WYKONANEJ
W KATEDRZE I ZAKŁADZIE HISTOLOGII GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO,
POD KIERUNKIEM PROF. DR HAB. MICHAŁA A. ŻMIJEWSKIEGO**

TYTUŁ PRACY:

**MODULACJA EKSPRESJI ELEMENTÓW SKÓRNEGO ANALOGU OSI PODWZGÓRZE-PRZYSADKA-
NADNERCZA (ANG. HPA) W PROCESIE RÓŻNICOWANIA KERATYNOCYTÓW – WPŁYW
WITAMINY D**

Praca doktorska pani mgr Justyny Wierzbickiej dotyczy fizjologii ludzkiej skóry. Skóra, to bardzo duży narząd, którego funkcje ochronne oraz funkcje związane z termoregulacją są dobrze znane i opisane. Coraz więcej wiadomo o aktywnej roli poszczególnych elementów komórkowych skóry w układzie odporności organizmu. Naskórek, jako miejsce syntezy witaminy D, jest także elementem układu regulacji homeostazy wapniowo-fosforanowej. Kolejną funkcją, która była zasadniczym tematem badań opisanych w ocenianej rozprawie, jest rola skóry w odpowiedzi na stres. Skóra w odpowiedzi na czynniki stresowe produkuje wszystkie elementy wchodzące w skład hormonalnej osi przysadkowo-podwzgorzowo-nadnerczowej (z ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA), odpowiadającej na uogólniony stres. Praca doktorska była wykonana pod opieką prof. dr hab. Michała Żmijewskiego, we współpracy z zespołem prof. Andrzeja Słomińskiego. Obaj uczeni od wielu lat zajmują się fizjologią skóry i mają wielkie zasługi w jej poznaniu.

Przedstawiona do oceny praca ma formę przewidzianą w Art. 13 p. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 3 czerwca 2016,

czyli stanowi „spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych”. W skład zbioru prac wchodzi dwie publikacje przeglądowe oraz dwie publikacje doświadczalne. Do każdej z prac dołączono zestaw oświadczeń autorów publikacji, w których każdy z nich przedstawił swój wkład w powstanie pracy. Pewien problem dla recenzenta stanowi fakt, że oświadczenia są dość ogólnikowe. Dotyczy to w szczególności prac doświadczalnych, w których zarówno Doktorantka, jak i niektórzy spośród pozostałych autorów zadeklarowali „udział w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych” bez podania konkretnych przeprowadzonych przez autorów rodzajów eksperymentów. Trudno jest więc ocenić zakres umiejętności doświadczalnych Doktorantki, co powinno być elementem recenzji doktoratu. Zakładam więc, że Doktorantka opanowała wszystkie techniki badawcze zaprezentowane w pracach, a jeśli tak nie jest, to proszę o wyjaśnienie podczas obrony.

Zbiór opublikowanych artykułów poprzedzony jest „Streszczeniem w języku polskim” oraz odpowiadającym mu streszczeniem w języku angielskim. Na streszczenie w języku polskim składają się: dwu i pół-stronicowe wprowadzenie, cele pracy przedstawione w dwóch punktach, pięć i pół-stronicowe omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz pół-stronicowe podsumowanie. Streszczenie jest więc bardzo krótkie i niestety nie uzupełnia w sposób wyczerpujący publikacji, które ze swojej natury muszą być zwarte. Jednym z wyraźnie brakujących elementów jest opis stosowanych w badaniach analogów/metabolitów witaminy D. Związki te są przedstawione tylko w postaci sumarycznych wzorów chemicznych, natomiast nie pokazano ani ich struktur, ani usytuowania w szlakach przemian metabolicznych witaminy D. Innym problemem jest używanie żargonu laboratoryjnego zamiast poprawnych opisów, na przykład linia HPEKp jest nazwana „komercyjną linią pierwotnych keratynocytów”, a test SRB „testem proliferacyjnym”. Ryzykowne jest także stwierdzenie ze strony 10, że „optymalny poziom witaminy D ... zmniejsza ryzyko występowania wielu chorób”. Uważam, że zdanie to wynika z błędnego zinterpretowania zidentyfikowanych korelacji jako związku przyczynowo-skutkowego. W przedstawionej pracy nieco zbyt skrótowe jest także podsumowanie. Tak naprawdę, w podrozdziale „Podsumowanie”, cała dyskusja przedstawionych w dwóch doświadczalnych pracach wyników zawiera się w jednym zdaniu (napisanym czcionką typu bold). Reszta to plany przyszłych badań. Ponieważ zasadnicza treść rozprawy doktorskiej

zawarta jest w dwóch publikacjach doświadczalnych, które wprawdzie zawierają dwa osobne rozdziały, w których przeprowadzona jest dyskusja wyników, to jednak wciąż brakuje całościowej dyskusji wyników zawartych w obu pracach.

W „Streszczeniu w języku polskim” znalazły się niestety także błędy gramatyczne:
str. 9 l. 22 „form” zamiast „formy”
str. 10 l. 23 „wytworzenie” zamiast „wytworzenia”

oraz niekonsekwentne stosowanie nazw dla witaminy D, która czasem jest nazywana jest witaminą D, a kiedy indziej witaminą D₃, przy czym nigdzie nie zdefiniowano, czy witaminą D nazwano zbiorczo witaminy D₂ i D₃.

Uwagi odnośnie treści streszczenia w języku polskim odnoszą się również do streszczenia w języku angielskim. Niestety w tej części pracy znalazło się dodatkowo wiele błędów językowych i edytorskich. Przytoczę tutaj tylko kilka przykładów:

str. 16 l. 14 „cause” zamiast „causes”
str. 16 l. 24 brakuje „the” przed „only”
str. 16 l. 25 „most well-known” zamiast „best known”
str. 16 l. 29 „1.25(OH)₂D₃” zamiast „1,25(OH)₂D₃”
str. 17 l. 4 „regulates” zamiast „regulate”
str. 17 l. 7 brak spacji
str. 18 l. 6 „autoimmunology” zamiast „autoimmunity”
str. 18 l. 7 „no” zamiast „not”
itd.

W rozdziałach napisanych w języku angielskim jest sporo zdań z niepoprawną składnią, a szczególnie trudne do zrozumienia jest zdanie ze strony 25 napisane czcionką typu bold. Nie zachowano też należytej staranności w przygotowaniu wykazu cytowanego piśmiennictwa, jest tam sporo drobnych błędów, a Jędrzej Śniadecki występuje jako Jerdrzej.

Pierwsza z wchodzących w skład rozprawy publikacji to praca przeglądowa, która jest tylko po części związana z tematem badań zadeklarowanym w celach pracy. Publikacja ta dotyczy głównie historii badań nad witaminą D, szlakami metabolicznymi prowadzącymi do powstania i degradacji hormonalnie aktywnej formy witaminy D (1,25D) oraz chorobami z nią związanymi. Bezpośrednio z rozprawą doktorską związany jest podrozdział „Alternative pathway leading to novel vitamin D analogs”. Niestety w tym podrozdziale również nie

podano struktur analogów, ani nie rozrysowano szlaków metabolicznych do nich prowadzących, co bardzo ułatwiłoby zrozumienie ich aktywności. Należy jednak podkreślić, że praca jest bardzo ciekawa. Opisano bardzo dużo faktów z historii badań nad witaminą D oraz z historii badań i terapii krzywicy. Praca ta mogłaby być lekturą obowiązkową dla wszystkich osób chcących zajmować się witaminą D. Niestety, minusem tej pracy są liczne błędy językowe. Przykładami są sformułowania: „than compared”, „rear diseases”, „do not possessed”, „it has to be stress out”, „to be underline”, itp.

Druga z wchodzących w skład rozprawy publikacji to również praca przeglądowa, opisująca fizjologię i niektóre stany patologiczne skóry. W części poświęconej fizjologii skóry główny nacisk położono na rolę skóry w produkcji witaminy D, oraz na rolę metabolitów witaminy D w prawidłowym różnicowaniu komórek skóry i w ich ochronie przed promieniowaniem UV. Ta publikacja językowo jest poprawna. Odnośnie zawartości merytorycznej, mam jedno pytanie. Na stronie 2016, w podrozdziale „Melanoma” napisano, że „in humans, VDR gene has multiple splicing variants...”, niestety nie powołano się w tym zdaniu na źródło literaturowe. Uprzejmie proszę o podanie tego źródła, gdyż jest to dla mnie nowa informacja. Wiem o istnieniu rozlicznych wariantów transkrypcyjnych genu VDR, wynikające z polimorfizmu warianty translacyjne białka VDR różniące się o trzy aminokwasy (424aa lub 427aa) są szeroko opisywane, znam również nieliczne doniesienia o istnieniu wariantów VDR wynikających z alternatywnych miejsc startu translacji VDRB1 (477aa) oraz VDRB2 (450aa), natomiast nie znam doniesień o różnych wariatach białka wynikających z alternatywnego składania RNA.

Trzecia publikacja jest pracą doświadczalną, opublikowaną w *Journal of Cellular Physiology*. W tej pracy wprowadzone zostaje pojęcie „skin HPA analog” (sHPA), bardzo istotne dla treści rozprawy doktorskiej. Deklarowanym celem tej pracy było „prześledzenie dynamiki zmian w poziomie ekspresji elementów osi HPA wraz z różnicowaniem się komórek naskórka”. Z treści publikacji wynika, że celem było również sprawdzenie, czy zmiany obserwowane w keratynocytach poddanych różnicowaniu w hodowli *in vitro*, odpowiadają tym obserwowanym w wycinkach prawidłowej ludzkiej skóry. Podczas indukowanego na dwa sposoby procesu różnicowania keratynocytów *in vitro* sprawdzano zarówno markery różnicowania, jak i poziom ekspresji genów i białek wchodzących w skład sHPA. Podczas czytania tej publikacji nasunęło mi się kilka pytań i uwag. Pierwsze dotyczy metodyki. Badania

wycinków prawidłowej ludzkiej skóry wykonano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, dzięki czemu uzyskano bardzo przejrzyste obrazy o dobrej rozdzielczości. Tymczasem badania komórek z hodowli *in vitro* wykonano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, przez co jakość obrazów jest dużo słabsza. Dlaczego, mimo dostępu do mikroskopu konfokalnego, nie wykorzystano tego narzędzia do wszystkich badań?

Dlaczego w komórkach z hodowli *in vitro* nie zbadano poziomu receptora glikokortykoidów (GR), który oznaczano w wycinkach skóry? Dla funkcjonowania osi HPA receptor ten jest bardzo istotny.

Proszę także o wyrażenie opinii Doktorantki, którą z zastosowanych metod różnicowania keratynocytów *in vitro* uważa za lepiej oddającą fizjologiczne różnicowanie prawidłowej ludzkiej skóry?

W pracy tej zauważyłam również błąd edytorski. W opisie rysunku 2G jest odwołanie do elementów zaznaczonych gwiazdkami, tymczasem na zdjęciu nie ma żadnych gwiazdek.

Ostatnia z przedstawionych publikacji dotyczy wpływu hormonalnej formy witaminy D, oraz jej analogów na poziomy ekspresji genów i poziomy białek wchodzących w skład sHPA. Najciekawszym, moim zdaniem, wynikiem tej pracy jest określenie, że wpływ badanych analogów na ekspresję poszczególnych genów jest w wielu przypadkach odmienny niż wpływ 1,25D. Ponieważ badane analogi są metabolitami witaminy D, proszę o zinterpretowanie tych zróżnicowanych aktywności w odniesieniu do miejsca analogów w szlakach metabolicznych witaminy D (aktywacja vs. dezaktywacja, działanie lokalne vs. uogólnione).

Prosiłabym jeszcze aby w odpowiedzi na moją recenzję Doktorantka wyraziła w oparciu o swoją wiedzę opinię, czy sHPA jest aktywowany tylko w wyniku stresu działającego lokalnie na skórę, czy jest także elementem odpowiedzi organizmu na uogólniony stres. Kolejne wynikające z tego pytanie dotyczy negatywnych efektów przewlekłego stresu, które są dobrze opisane w kontekście działania ludzkiego układu odporności oraz układu nerwowego. Czy negatywne efekty ekspozycji na chroniczny stres dotyczą także funkcjonowania skóry?

Przedstawiona do oceny praca niewątpliwie stanowi oryginalny wkład w rozumienie fizjologii skóry oraz wpływu 1,25D i jej metabolitów na skórę. Niezwykle istotny dla oceny wartości tej rozprawy jest fakt, że Doktorantka jest autorką czterech opublikowanych prac, z czego dwie doświadczalne, których jest pierwszą autorką, ukazały się w prestiżowych czasopismach. Moje uwagi są bądź natury edytorskiej i językowej (te niestety są dość liczne),

lub wynikają z pewnych nieudomówień będących rezultatem zbyt skrótowego, moim zdaniem, wstępu dołączonego do publikacji. Formuła prezentacji rozpraw doktorskich w formie „spójnego tematycznie zbioru artykułów” jest dość i pewnie za jakiś czas utrzyma się konsensus dotyczący prezentacji takich rozpraw, tak aby recenzent uzyskał klarowne wprowadzenie w tematykę, oraz zbiorczą dyskusję wszystkich uzyskanych w publikacjach wyników.

Analizując pracę doktorską pani mgr Justyny Wierzbickiej stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

z poważaniem



Ewa Marcinkowska