



KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1
tel. 0 58 349 14 37
fax 0 58 349 14 19
e-mail: histolog@gumed.edu.pl

Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 230
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska

Tel: +48 583491455
Fax: +48 583491419
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 14.02.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Aoife Corcoran

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Aoife Corcoran** jest: „**Testing calcemic and non-calcemic activities of new vitamin D2 analogues via *in vitro* and *in vivo* studies**”. Promotor pracy: Prof. dr hab. Ewa Marcinkowska Zakład Biotechnologii Białek, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Witamina D₃, naturalnie powstaje w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego emitowanego przez słońce, a następnie ulega sekwencyjnej modyfikacji poprzez hydroksylację w wątrobie i nerkach. Aktywna forma witaminy D₃ (kalcytriol, 1,25(OH)₂D₃) pełni istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak zachowanie homeostazy wapniowo-fosforanowej oraz wpływa na prawidłowe działanie układu nerwowego, mięśniowego, immunologicznego oraz skóry. Witamina D reguluje również wzrost i różnicowanie się komórek, co zapewnia prawidłowy proces odnowy bariery naskórkowej, czy też dojrzewania komórek układu odpornościowego.

Od wielu lat obserwuje się ogólnoswiatowy niedobór witaminy D, który związany jest z znacznym ograniczeniem ekspozycji na światło słoneczne lub niedostateczną suplementacją. Oprócz klasycznych schorzeń związanych z niedoborem witaminy D (osteoporozy czy krzywicy), jej niedobór wiązany jest ze zwiększoną zapadalnością lub nasileniem symptomów wielu chorób cywilizacyjnych, w tym, nowotworów. Co więcej, witamina D oraz jej pochodne skutecznie hamuje wzrost komórek nowotworowych, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* oraz w licznych próbach klinicznych. Z uwagi na możliwość wystąpienia hiperkalcemii, na skutek zastosowania wysokich dawek 1,25(OH)₂D₃, poszukuje się analogów witaminy D cechujących się wysoką aktywnością antyproliferacyjną i immunomodulacyjną ale o niewielki wpływie na gospodarkę wapniowo-fosforanową.

Rozprawa doktorska Aoife Corcoran świetnie wpisuje się w nurt najnowszych badań, wiążąc przewidywania teoretyczne dotyczące modyfikacji struktury witaminy D z badaniami aktywności nowo uzyskanych związków *in vitro* i *in vivo*.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana, jako monografia zgodnie z tak zwanym „starym trybem” (zgodnie z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 września 2011 r., będącym nowelizacją art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Rozprawa zawiera, aż 168 stron maszynopisu z bardzo licznymi rysunkami i tabelami, które bardzo dobrze ilustrują i podsumowują omawiane zagadnienia. Warto zwrócić uwagę, że część prezentowanych badań w rozprawie, zostało już opublikowanych w kilku manuskryptów, a **Aoife Corcoran jest współautorką pięciu prac doświadczalnych związanych z tematyką rozprawy, w tym dwóch, jako pierwszy autor, co świetnie podkreśla jej zaangażowanie w prace badawczą oraz dojrzałość naukową.**

b) ocena uzyskanych rezultatów

Główna część rozprawy doktorskiej Aoife Corcoran opiera się na wynikach badania aktywności biologicznej trzech grup nowych pochodnych witamin D₂. Warto podkreślić, że związki te powstały w ramach międzynarodowego Projektu DECIDE, obejmującego syntezę i poszukiwanie analogów witamin D. Pierwsza grupa były to geometryczne izomery 1,25(OH)₂D₂ posiadające pojedyncze modyfikacje w łańcuchach bocznych (SPM). Druga grupa to analogi 1,25(OH)₂D₂ posiadające dwie modyfikacje (DPM). Trzecia grupę stanowiły analogi (DPM) pozbawione węgla w pozycji 19 (*19-nor*). Autorka wykorzystując dobrze scharakteryzowany model komórkowy ostrej białaczki szpikowej (linia HL60) porównała wpływ badanych związków na proces różnicowania się komórek, przy użyciu dwóch standardowych markerów powierzchniowych: CD11b i CD14. Następnie porównywała uzyskane wyniki do doświadczalnie oznaczonego powinowactwa badanych związków do receptora dla witaminy D (VDR). W przypadku obu grup analogów DPM doktorantka zbadała również obecność receptora VDR oraz izoform czynnika transkrypcyjnego indukującego różnicowanie się komórek blastycznych - C/EBPα, we frakcji jądrowej lizatów komórkowych, po upływie 24 oraz 72 godzin od podania związków. W przypadku grupy izomerów DPM (*19-nor*) doktorantka wykazała również podwyższenie względnego poziomu mRNA dla markera CD14 oraz białka uczestniczącego w dezaktywacji witaminy D (CYP24A1). Dodatkowo, autorka zbadała również aktywację szlaku sygnalizacyjnego MAPK (fosforylację kinaz ERK1/2). W drugim rozdziale autorka próbowała odpowiedzieć na pytanie, dlaczego niektóre linie komórek białaczki nie odpowiadają na stymulację analogami witaminy D stosując modulatory epigenetyczne (inhibitory metylotransferazy DNA (DNMTi) oraz deacetylazy histonów (HDACi)).

Wśród najistotniejszych wyników składających się na rozprawę doktorską Aoife Corcoran należy wymienić:

- Wykazanie zależności między strukturą oraz modyfikacjami łańcucha bocznego analogów witaminy D₂ a ich aktywnością biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem badań nad izomerami geometrycznymi.
- Wykazanie, że wydłużenie łańcucha bocznego 1,25(OH)₂D₂ o jedną grupę metylową lub dwie grupy metylowe może zwiększać potencjał przeciwbiałaczkowy analogów witaminy D₂, a obrócenie łańcucha bocznego (izomeryzacja geometryczna - 24Z), dodatkowo modyfikuje tę aktywność.
- Wykazanie, że izomeryzacja (5E, 7E) obniża aktywność biologiczną analogów witaminy D₂ niezależnie od wprowadzania dodatkowych modyfikacji (SPM, DPM).
- Wykazanie, że potrójna modyfikacja (związek PRI-1743): izomer (5E, 7E), dodatkowa grupa hydroksylowa przy C-22 oraz izomeryzacja 24R, prowadzi do całkowitej utraty aktywności biologicznej związku. PRI-1743 bardzo słabo wiąże się do receptora VDR i nie działa również, jako antagonistą tego receptora.
- Wykazanie, że siła wiązania badanych analogów witaminy D₂ do receptora VDR nie zawsze odzwierciedla ich aktywność biologiczną, co wskazuje na istnienie – innych czynników wpływających na aktywność tych związków.
- Zbadanie, dwóch potencjalnych szlaków modulowanych przez witaminę D i jej nowe analogi. Wykazanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego C/EBPα, oraz niewielkiej aktywacji szlaku MAPK (fosforylacja kinaz ERK1/2) przez wybrane związki.
- Wykazanie, że związki PRI-5201 i PRI-5202 posiadają podwyższoną w stosunku do 1,25(OH)₂D₃, aktywności biologicznej w teście stymulacji różnicowania komórek białaczkowych (linia HL60). Uzyskane wyniki korelowały z podwyższonym powinowactwem badanych związków do receptora VDR oraz z podwyższoną ekspresją genów CD14 i CYP24A1 (dokładnej względny poziom mRNA).
- Wykazanie, że szereg badanych izomerów (PRI-1907, PRI-5201 i PRI-5202) charakteryzuje się osłabionym wpływem na poziom wapnia u myszy, w porównaniu do 1,25(OH)₂D₃, co biorąc pod uwagę ich wysoką aktywność biologiczną, sugeruje ich potencjalne zastosowanie w terapii białaczki oraz innych nowotworów.
- Wykazanie, że zastosowanie modulatorów epigenetycznych (DNMTi i/lub HDACi) może zwiększać wrażliwość linii białaczkowych (KG1 oraz HL60) na działanie 1,25(OH)₂D₃, co może znaleźć zastosowanie w planowaniu terapii.

Należy podkreślić, że przedstawione do oceny wyniki badań, mają **szereg potencjalnych aplikacji praktycznych**, zarówno, jeśli chodzi o dalsze planowanie modyfikacji witaminy D w kierunku wyższej aktywności antynowotworowej przy obniżonym wpływie na poziom wapnia, jak i w planowaniu samej terapii w oparciu o najefektywniejsze analogi, ze szczególnym uwzględnieniem (PRI-5201 i PRI-5202).

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Praca napisana jest po angielsku, a czytający nie ma problemu, ze zrozumieniem jej treści, ani z podążaniem za logiką przedstawianych wyników. Bardzo pomocne są również bardzo dobrze przygotowane schematy badanych związków wraz z dobrym

oznaczeniem modyfikacji. Praca jest bardzo obszerna (168 stron) stąd też autorka nie uniknęła niewielkich błędów, głównie tak zwanych literówek. Np. w spisie treści „Leukemeia”.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Aoife Corcoran bardzo dobrze porusza się zarówno w terminologii chemicznej, klinicznej, jak i biochemicznej. Wstęp do rozprawy zawiera liczne dobrze dobrane odnośniki literaturowe. Wydaje mi się, że o ile przedstawione informacje dotyczące modeli hematopoezy oraz klasyfikacji białaczek są poprawne, to warto byłoby uzupełnić te informacje o dane z najnowszych publikacji, czy rekomendacji.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Podjęta tematyka włącza się bardzo dobrze w nurt światowych badań nad nowymi związkami o własnościach przeciwnowotworowych. Warto, zwrócić uwagę, że jest to kolejna praca doktorska będąca efektem działania międzynarodowego zespołu skupiającego badaczy z różnych dziedzin (Projekt DECIDE), który konsekwentnie zmierza do optymalizacji struktury pochodnych witaminy D, w kierunku zwiększenia ich aktywności biologicznej oraz obniżenia potencjalnych efektów ubocznych. Praca ta świetnie charakteryzuje nowe pochodne witaminy D, wskazując na związki o podwyższonej aktywności w stosunku do naturalnie występującego kalcytriolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) oraz wyznaczając dalsze kierunki modyfikacji. Dodatkowym, atutem pracy są badania nad modyfikacją epigenetyczną komórek w celu podwyższenia ich aktywności na pochodne witaminy D. Z uwagi na obserwowane przez doktorantkę rozbieżności między aktywnością analogów a ich powinowactwem do VDR, ciekawy jestem, czy analogi te testowane były również na liniach białaczkowych opornych, lub obniżonej wrażliwości na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

Autorka wykorzystowała klasyczną metodę do badania aktywności związków o charakterze przeciwnowotworowych na modelu linii białaczkowych opierając się na zwiększeniu się ekspresji powierzchniowych antygenów CD11b oraz CD14 pod wpływem potencjalnych induktorów różnicowania się komórek. Do pomiarów wykorzystowała detekcję przeciwciałami oraz cytometrię przepływową. Autorka podjęła również próbę prześledzenia mechanizmu aktywacji różnicowania się komórek linii białaczkowych poddanych działaniu nowych pochodnych witaminy D. W tym celu zastosowała kompetycyjny test na wiązanie pochodnych witaminy D do receptora VDR oraz zbadała translokację receptora VDR do jądra komórkowego, aby wykazać korelację między aktywnością, a aktywacją VDR. Dodatkowo, dla wybranych związków (głównie z trzeciej grupy), autorka zbadała wpływ analogów na poziom mRNA *CD14* oraz *CYP24A1* przy wykorzystaniu techniki Real Time PCR. Doktorantka postanowiła również zbadać alternatywne mechanizmy indukcji różnicowania się komórek, wykorzystując immunologiczną detekcję czynnika transkrypcyjnego C/EBP α w ekstraktach jądrowych

komórek HL60, oraz fosforylację białek ERK1/2 (western blot). Dodatkowo, autorka zastosowała EpiQ chromatin Assay Kit do zbadania rozluźnienia (dostępności) chromatyny w rejonie genu VDR. Badania te zasugerowały istnienie potencjalnych mechanizmów epigenetycznych wpływających na ekspresję VDR w różnych liniach białaczkowych. Kontynuując badania doktorantka wykazała wpływ czynników epigenetycznych, w tym inhibitorów DNMTi i/lub HDACi na zwiększenie wrażliwość linii białaczkowych (KG1 oraz HL60) na działanie 1,25(OH)₂D₃. Na szczególną uwagę zasługują również wyniki badań poziomu wapnia u myszy poddanych działaniu nowych analogów witaminy D.

O ile same przedstawione wyniki są w zdecydowanej większości bardzo jasno przedstawione, a ich interpretacja nie budzi zastrzeżeń, to z uwagi na funkcję recenzenta mam kilka uwag i pytań. Wydaje mi się, że uzyskane dane wymagają bardziej wnikliwej analizy statystycznej, brak takiej analizy bardzo ogranicza możliwość wyciągania wniosków, a formułowanie wniosków bez wykazania znamiennej statycznie wyników jest niewskazane. Moje sugestie:

- Grafy przedstawiające ekspresję powierzchniowych markerów (CD11b oraz CD14) powinny pokazywać wyniki porównania nie tylko dla poszczególnych stężeń dla każdego ze związków, ale również pomiędzy poszczególnymi związkami.
- W tabelach pokazujących względną siłę wiązania związków warto byłoby również pokazać odchylenia standardowe oraz wyniki analizy statystycznej.
- Podobnie, grafy przedstawiające wyniki analizy densytometrycznej prążków (np. Figura 7.5 i kolejne) również mogłyby być wzbogacone o analizę statystyczną. Czy na rysunku - Figure 7.5, żaden z punktów pomiarowych nie był statystycznie różny od kontroli?
- Brakuje analizy statystycznej dla wyników pomiaru względnej ilości mRNA dla CD14 i CYP24A1 (Figure 7.16 i 7.17).
- W całej sekcji II (od punktu 7.2) nie znalazłem informacji o analizie statystycznej przedstawionej wyników, chociaż trzeba przyznać, że w większości przypadków różnice między badanymi grupami są znaczne i dobrze interpretowane.

Pozwolę sobie na jeszcze jedną uwagę dotyczącą metody izolacji frakcji jądrowej. Czy autorka sprawdziła, czy uzyskane frakcje jądrowe nie zawierają białek cytoplazmatycznych, lub pochodzących z innych organelli komórkowych. Warto również na przyszłość pomyśleć o innym markerze frakcji jądrowej, bo β-aktyna jest białkiem charakterystycznym dla cytoszkieletu. Dodatkowo, aby zbadać wpływ badanych analogów na translokację VDR, czy C/EBPα do jądra komórkowego, warto byłoby ocenić również ilość badanych białek we frakcji cytoplazmatycznej (lub w pełnym lizacie komórkowym).

Chciałbym podkreślić, że pomimo wyżej wymienionych uwag, **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Aoife Corcoran, oraz znaczny jego rozwój, oraz konsekwentne planowanie i wykonywanie doświadczeń.** Świadczy o tym, wielokierunkowa charakterystyka trzeciej grupy związków (19-nor) uwieńczona doświadczeniami *in vivo* potwierdzającymi obniżony wpływ na wapń w porównaniu do 1,25(OH)₂D₃ u myszy.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma poprawny układ, zawiera dokładny spis treści, bardzo istotny spis skrótów, streszczenia w języku angielskim, bardzo obszerny wstęp, cele pracy, materiały metody, rezultaty oraz dyskusję. Główna część pracy kończą dobrze sprecyzowane wnioski. Praca zawiera jeszcze dodatek, na który składają się uzupełniające wyniki uzyskane przez Aoife Corcoran w trakcie realizacji projektu doktorskiego. Praca zawiera również spis publikacji, których jest doktorantka jest autorem, oraz spis rycin i tabel.

Zgodnie ze spisem treści rozprawa doktorska zakończona jest listą cytowanej literatury, chociaż ostatnim rozdziałem jest streszczenie w języku polski, które powinno chyba znajdować się zaraz za streszczeniem w języku angielskim.

Z uwagi na funkcję recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka szczegółów, które w żaden sposób nie obniżają wartości merytorycznej ani naukowej ocenianej rozprawy:

- - W streszczeniu brak podsumowania lub próby sformułowania ogólnych wniosków. Co jest głównym osiągnięciem? Jak można je wykorzystać w praktyce lub dalszych badaniach?
- - Wstęp jest trochę za bardzo rozbudowany i wydaje mi się, że części dotycząca hematopoezy, opisu komórek krwi, oraz klasyfikacji białaczek są zbyt długie i nie do końca odnoszą się do wyników badań przedstawionych. Z drugiej strony stanowią świetną podstawę do artykułu przeglądowego.
- Wydaje mi się, że wstęp powinien zawierać nieco bardziej rozbudowany rozdział dotyczący badań aktywności pochodnych witaminy D na różnych modelach (*in vivo*, *in vitro*) czy też o badaniach klinicznych. (Bardzo krótkie podrozdział 3.3.4)

3) wnioski końcowe (konkluzja).

Podsumowując, monografia Aoife Corcoran oparta jest o bardzo dobrze przygotowaną serię doświadczeń, zawiera dobrze opisane i zilustrowane wyniki oraz poprawnie przeprowadzoną dyskusję. Na dodatkowe podkreślenie zasługuje fakt, że spora część przedstawionych wyników została już opublikowana, a doktorantka jest autorem 5 manuskryptów dotyczących badań nad aktywnością biologiczną analogów witaminy D, w tym w dwóch z nich jest pierwszy autorem. Uważam, więc że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani Aoife Corcoran do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo wnioskuję o wyróżnienie pracy z uwagi na znaczną ilość przeprowadzonych badań, wskazujących na potencjalne zastosowania analogów witaminy D w terapii nowotworów oraz na znaczny dorobek naukowy doktoranta.



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,