

dr hab. n. med. Agnieszka Bojarska-Junak
Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Marchwickiej

pt.: „*Regulacja receptora dla witaminy D (VDR) przez dwie ścieżki sygnałowe*”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej

w Zakładzie Biotechnologii Białek

Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Marchwickiej dotyczy regulacji receptora dla witaminy D (VDR). Jako model badawczy wybrano ostre białaczki szpikowe (AML). W AML w procesie hematopoezy, dochodzi do blokady szlaku różnicowania komórek linii mieloidalnej, co powoduje nagromadzenie niedojrzałych komórek oraz brak ich różnicowania do monocytów/makrofagów. W większości przypadków AML pozostaje chorobą nieuleczalną. Jednak duże nadzieje wiąże się z „terapią celowaną” z wykorzystaniem związków indukujących różnicowanie blastów m.in. w kierunku monocytarno-makrofagowym lub granulocytarnym. Do takich substancji zaliczamy kwas całkowicie trans-retinowy (ATRA) oraz 1,25-dihydroksywitaminę D₃ (1,25D₃). W swojej pracy Doktorantka postawiła hipotezę, że receptory kwasu retinowego regulują transkrypcję genu kodującego VDR. Ostre białaczki szpikowe pozostają wyzwaniem dla współczesnej medycyny a otrzymane przez Autorkę wyniki mogą być przydatne w opracowaniu skutecznej, bardziej efektywnej terapii różnicującej komórki blastyczne w kierunku monocytów/makrofagów lub granulocytów.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 189 stron maszynopisu i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim. Po nich następuje bardzo obszerny liczący 47 stron *Wstęp*, który wprowadza czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po *Wstępie* Doktorantka zamieściła *Hipotezę i cele badawcze*, opis *Materiałów i metod* (21 stron), *Wyniki* (42 strony), *Dyskusję* (14 stron), *Wnioski*, *Spis Rysunków* i *Tabel*. Rozprawa zakończona jest *Wykazem publikacji*, który jest zestawieniem dorobku naukowego Doktorantki (9 publikacji współautorstwa Doktorantki bezpośrednio związanych z rozprawą) oraz *Bibliografią* (443 pozycje). Praca ilustrowana jest 57 rysunkami. Umieszczono w niej 20 tabel.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp teoretyczny ocenianej rozprawy jest bardzo obszerny (47 stron). Omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia zarówno celów rozprawy, jak i logiki wykonywanych badań. W przystępny i komunikatywny sposób opisano mielopoezę, ostre białaczki szpikowe (AML) i ich patogenezę. Doktorantka zwróciła również uwagę na deregulację ścieżek sygnałowych oraz znaczenie mutacji w genach czynników transkrypcyjnych w AML. W trzeciej części wstępu odniosła się do receptorów jądrowych ze szczególnym uwzględnieniem receptorów dla witaminy D oraz witaminy A. Ostatnia czwarta część *Wstępu* poświęcona jest terapii indukującej różnicowanie w odniesieniu do ostrych białaczek szpikowych. Lektura *Wstępu* niewątpliwie dokumentuje dużą wiedzę Autorki w przedmiocie rozprawy. Uważam jednak ten rozdział za zbyt rozbudowany. Uwaga ta jednak nie zmienia mojej pozytywnej oceny rozdziału.

Cel pracy to bardzo zwięzłe przedstawienie (w kilku punktach) konkretnych celów badawczych zrealizowanych w toku badań. Cele pracy są jasno sprecyzowane i zgodne z tematem rozprawy.

Materiał i metody zostały opisane w osobnych podrozdziałach. Na uwagę zasługuje zastosowanie szerokiego wachlarza badań doświadczalnych. W podrozdziałach 3.1–3.8 Doktorantka wymieniła stosowane materiały wraz z podaniem źródeł odczynników oraz zastosowaną aparaturę. Podrozdziały te zostały zredagowane bardzo dokładnie. Niektóre informacje, jak np. rodzaj stosowanej wirówki nie mają praktycznego znaczenia dla jakości doświadczeń i moim zdaniem mogłyby zostać pominięte.

W podrozdziałach 3.9–3.23 przedstawiono metody, które zostały prawidłowo dobrane do realizacji założonych celów. W mojej opinii zρέcziej byłoby umieścić opis metody łącznie z wykorzystanymi odczynnikami (tabelka z wyodrębnionymi odczynnikami + opis metody w jednej przestrzeni). Tego typu zabiegi redakcyjne sprzyjałyby logicznej spójności opracowania *Materiałów i metod*. Ogólnie w opisie niektórych metod zbrakło mi dokładniejszych informacji umożliwiających powtórzenie badań. Doktorantka adekwatnie dobrała model badawczy, gdyż białaczkowe linie komórkowe stanowią dobry model *in vitro* dla badań mechanizmów różnicowania komórek nowotworowych.

W podrozdziale 3.10 (*Określenie stopnia zróżnicowania komórek w cytometrii przepływowej*) nie uzasadniono dlaczego komórki kontrolne (niestymulowane ATRA i/lub IFN) traktowano etanolem? Czy komórki kontrolne nie powinny być hodowane w tym samym medium hodowlanym i przez analogiczny okres czasu jedynie bez obecności stymulatorów a następnie poddane takiej samej procedurze znakowania przeciwciałami jak komórki stymulowane? Zwracam również uwagę, że etanol często wykorzystywany do utrwalania i/lub permeabilizacji komórek może przyczyniać się do znaczącego spadku wiązania przeciwciał z komórkami. Według standardowej procedury antygeny powierzchniowe znakowane są na komórkach nieutrwalonych. W podrozdziale 3.10 zbrakło mi również informacji o sposobie analizy cytometrycznej antygenów CD14 lub CD11b. Czy oceniano odsetek komórek pozytywnie wyznakowanych przeciwciałami monoklonalnymi? Czy też określano gęstość antygeny na powierzchni komórek?

Podrozdziały 3.14, 3.15 oraz 3.16 opisują różne metody frakcjonowania komórek. Zbrakło mi jasnego wyjaśnienia w jakim celu zastosowano trzy różne metody? Celem optymalizacji? Ponadto, która z metod została ostatecznie wykorzystana? W poszczególnych sposobach frakcjonowania zbrakło mi podania stężenia inhibitorów proteaz i fosfataz. Ponadto, nie był dla mnie jasny system wykorzystania 1,25D₃ i/lub ATRA: w podrozdziale 3.14 – zastosowano tylko 1,25D₃, w podrozdziale 3.15 nie podano informacji o wykorzystaniu 1,25D₃ i/lub ATRA, natomiast

w podrozdziale 3.16 wykorzystano 1,25D₃ oraz ATRA. Dlaczego w poszczególnych metodach frakcjonowania stosowano różne czasy inkubacji komórek z 1,25D₃ i ATRA?

W podrozdziale 3.19 Doktorantka podaje, że komórki inkubowano z 1,25D₃ i/lub ATRA lub agonistami/antagonistami RAR „przez określony dla danego eksperymentu czas”. Jaki to czas?

W poszczególnych podrozdziałach *Materiałów i metod* zabrakło mi informacji w ilu powtórzeniach przeprowadzono poszczególne eksperymenty oraz które linie komórkowe wykorzystano do poszczególnych eksperymentów? Dla lepszej przejrzystości stosowanych metod i zaplanowanych doświadczeń można było przedstawić schemat poszczególnych doświadczeń.

Wyniki pracy to szeroka analiza regulacji genu VDR przez retinoidy oraz przez szlak FGFR1. Przeprowadzenie tak obszernej analizy wymagało dużej skrupulatności i nakładu pracy. Interpretacja uzyskanych wyników jest prawidłowa. Generalnie wysoko oceniam jakość techniczną wyników oraz poprawność wyciąganych wniosków. W tej części recenzji pragnę jednak poruszyć kilka kwestii, co do których mam uwagi lub wątpliwości.

- Wyniki licznych doświadczeń i analiz przedstawiono wyłącznie w formie obrazowej w postaci wykresów. Zabrakło mi kilku zbiorczych tabel, które przedstawiałyby wyniki również w formie numerycznej, co ułatwiłoby ich zrozumienie.

- W ocenie poziomu ekspresji genów *VDR*, *CYP24A1* lub *RAR* brakuje mi informacji/wzoru przedstawiającego jak określono poziom ekspresji badanego genu? Jak obliczono ekspresję względną (RQ)? Doktorantka nie wyjaśnia tego w *Materiałach i metodach*, nie czyni tego również w *Wynikach*. Natomiast na wykresach przedstawiających ekspresję genu zamieszczono skrót RQ bez objaśnienia co on oznacza. Czytelnik, o ile nie jest dobrze wprowadzony w tematykę, może nie wiedzieć z czym ma do czynienia.

- Nie jest dla mnie jasne dlaczego poziom ekspresji genu *CYP24A1* oceniano tylko po 96h a poziom ekspresji genu *VDR* po 24, 48, 72 i 96h. Być może dla jasności należało przedstawić schemat analiz na skali czasu (np. w *Materiałach i metodach*).

- Podrozdział 4.1.4. a także podrozdziały 4.1.15 i 4.2.1 - ponownie zwracam uwagę na nieprecyzyjność określenia „*pomiar ekspresji markerów powierzchniowych*”. Badając ekspresję markera/antygeny możemy oceniać powszechność jego występowania tzn. na ilu komórkach występuje (parametr wyrażany w %). Dodatkową charakterystyką jest określenie siły ekspresji badanych antygenów, np. jak licznie występuje on na powierzchni ocenianych komórek, co jest przedstawiane jako intensywność fluorescencji / ilość miejsc wiążących przeciwciało. Doktorantka stosuje określenie „*zaobserwowano podwyższony poziom markera ...*” Podczas gdy na rycinie przedstawiono odsetek komórek wykazujących ekspresję CD14 lub CD11b. W związku z tym co oznacza MCF (*mean channel of fluorescence*) – w podpisie ryciny 54 (podrozdział 4.2.7)? Szkoda, że Doktorantka oceniając zmianę ekspresji markerów CD14 i CD11b pod wpływem 1,25D₃ lub ATRA nie przedstawiła przykładowych obrazów z analizy cytometrycznej.

- Podrozdział 4.1.5 - zabrakło mi krótkiego uzasadnienia dlaczego wpływ selektywnych agonistów receptora RAR na ekspresję genu *CYP24A1* oceniono tylko w liniach HL60 i KG1. Dlaczego nie wykorzystano innych linii białaczkowych również w kolejnych analizach?

- Podrozdział 4.1.12 - Autorka podaje, że linie komórkowe HL60 i KG1 poddano stymulacji 1,25D₃ lub ATRA przez 24h, 48h, 72h i 96h. Następnie zbadano profil ekspresji czynników transkrypcyjnych C/EBP. Dlaczego, więc na wykresach (Rys. 39 i 40) przedstawiających otrzymane wyniki umieszczono czas inkubacji 3h, 24h i 96h? Który czas jest właściwy. Niestety tych czasów inkubacji nie można zweryfikować sięgając do *Materiałów i metod*.

- Podrozdział 4.1.13 - Linię KG1 poddano stymulacji 1,25D₃ i/lub ATRA przez 3h, 24h, 48h, 72h i 96h (str. 105). Dlaczego więc na rys. 42A-42D przedstawiono wyniki uzyskane wyłącznie dla czasów 3h, 24h, 96h. Czasy inkubacji 48h i 72h zostały pominięte. Ponadto, z danych zawartych na rysunku 42 wynika że jednoczesne traktowanie komórek 1,25D₃ + ATRA wskazuje na efekt synergistyczny. Dlaczego jednak w tym przypadku nie podano wyników dla różnych punktów czasowych? Jaki był czas inkubacji z 1,25D₃ + ATRA (Rys. 42A-42D)?

- Rys. 46: na wykresach umieszczono czasy stymulacji 3h, 24h i 96h a w podpisie rysunku podano informację, że komórki stymulowano 1,25D₃ lub ATRA przez 24h, 48h oraz 96h.

Dyskusja jest omówieniem znaczenia uzyskanych wyników. Nie mam zastrzeżeń do tej części rozprawy. Autorka umiejętnie konfrontuje uzyskane wyniki z rezultatami przedstawionymi w literaturze naukowej. Rozdział ten jest podsumowaniem całości danych doświadczalnych, wobec tego Doktorantka w naturalny sposób odwołuje się do efektów doświadczeń opisanych w rozdziale *Wyniki*, uzupełniając je o dodatkową analizę i komentarz. Autorka podzieliła *Dyskusję* na dwa podrozdziały tematyczne, które porządkują informacje oraz ułatwiają czytanie. Doktorantka wzbogaciła *Dyskusję* o trzy ryciny, co dodatkowo potwierdza zdolności Autorki do trafnego wyciągania wniosków. Podobnie wysoko oceniam jasno sformułowane **Wnioski**, które odpowiadają na wyznaczone cele. *Wnioski* znajdują pokrycie w przeprowadzonych badaniach i uzyskanych wynikach.

Chciałabym również podkreślić, że w **Wykazie publikacji** mgr Aleksandra Marchwicka wyszczególniła publikacje swojego autorstwa i współautorstwa, których tematyka wiąże się z rozprawą.

Bibliografia pracy jest bardzo obszerna, liczy aż 443 pozycje przedstawiające zagadnienia związane z tematem badań. Wykorzystywane pozycje w przeważającej części są to prace anglojęzyczne z okresu 1978-2016. Najnowsze piśmiennictwo (2010-2016) stanowi ok. 19% przywoływanej bibliografii. Recenzent nie ma większych zastrzeżeń odnośnie sposobu wykorzystania przedstawionych prac. Tak duża liczba cytowanych pozycji świadczy o dużej dociekliwości w gromadzeniu informacji z piśmiennictwa światowego z zakresu badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Z drugiej jednak strony może nasuwać wątpliwości co do ich rzeczywistego i właściwego doboru. Szczególnie intrygujące jest powołanie się na pracę opublikowaną w języku koreańskim (poz. 156). W spisie literatury brak jest konsekwencji w jej sporządzaniu:

- W pozycjach 218, 344, 357, 369, 370 brak jest roku wydania publikacji,
- W pozycjach 309, 328 brakuje tytułu czasopisma (podano wyłącznie tytuł publikacji)
- W większości pozycji Doktorantka podaje rok, miesiąc, tom i numery stron. Jednak w niektórych pozycjach (np. 41-44, 46, 75, 77, 90, 91, 93, 161, 180) brakuje miesiąca. Doktorantka czasami podaje numer czasopisma.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim. Cała praca napisana bardzo starannie, praktycznie bez błędów typograficznych. Pojedyncze błędy literowe: „będatej” powinno brzmieć będącej, „wartości różnice się” powinno brzmieć: wartości różniące się, „przeprowadzone” powinno brzmieć: przeprowadzone; „komorki” powinno być: komórki. Przy przygotowywaniu przyszłych prac warto unikać wspomnianej powyżej braku konsekwencji w sporządzaniu bibliografii.

Podsumowanie recenzji

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marchwickiej pt.: „Regulacja receptora dla witaminy D (VDR) przez dwie ścieżki sygnałowe” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka w rozprawie wykazała się znajomością swojej tematyki badawczej oraz umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z przeprowadzonych badań. W swojej pracy Doktorantka zaprezentowała zróżnicowany warsztat metodyczny, co podnosi wiarygodność uzyskanych wyników. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę otwierają dalsze perspektywy badawcze oraz aplikacyjne. Przedłożona rozprawa doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Chciałabym podkreślić, że przedstawione przeze mnie wątpliwości i powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny. Nie umniejszają one wartości naukowej rozprawy, a dotyczą głównie sposobu prezentacji wyników i są jedynie sugestią, którą Autorka może wykorzystać podczas przedstawiania rezultatów badań w przyszłości. Moja recenzja jest jak najbardziej pozytywna.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Marchwickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Bojarska-Junak

dr hab. n. med. Agnieszka Bojarska-Junak