



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,  
Kierownik Katedry  
Katedra Histologii,  
Gdański Uniwersytet Medyczny,  
ul. Dębinki 1a, Pokój 15  
80-210 Gdańsk, Pomorskie  
Polska  
Tel: +48 583491455  
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 10.10.2023

### Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Weroniki Berkowskiej

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani mgr Klaudii Berkowskiej** jest: „Badanie aktywności i mechanizmu działania semiselektywnych agonistów receptora witaminy D w komórkach pochodzących z różnych tkanek”.

Promotor pracy: **Prof. dr hab. Ewa Marcinkowska, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski we Wrocławiu.**

#### 1) Ocena merytoryczna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana została w formie monografii, na podstawie, Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Manuskrypt zawiera, aż 249 numerowanych stron, w tym, 96 ryciny i 46 tabele. I chociaż manuskrypt nie opiera się na publikacjach naukowych, to warto podkreślić, że mgr Klaudia Berkowska jest autorką **10 publikacji** poświęconych analogom witaminy D, a więc jej wkład w rozwój naszej wiedzy o mechanizmach aktywowanych przez analogi witaminy D jest z pewnością znaczny.

#### a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Aktywna forma witaminy D –  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  jest to hormon sekosteroidowy o bardzo szerokim spektrum działania. Oprócz klasycznego wpływu na układ kostny, witamina D reguluje również pracę mięśni, komórek nerwowych, układu odpornościowego oraz proces odnowy bariery naskórkowej. W ostatnich latach coraz więcej danych klinicznych oraz publikacji naukowych wskazuje na przeciwnowotworowe działanie witaminy D oraz jej analogów. Wydaje się, że witamina D nie tylko jest istotna z punktu widzenia prewencji nowotworów, ale również może znaleźć zastosowanie w terapii opartej na zastosowaniu odpowiednio wysokich dawek. Niestety długotrwałe przyjmowanie wysokich dawek witaminy D może wiązać się z rozwojem hiperkalcemii, dlatego też wiele laboratoriów na całym świecie poszukuje nowych analogów witaminy D, o obniżonym wpływie na gospodarkę wapniowo-fosforanową, ale przynajmniej o zbliżonej do  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktywności przeciwnowotworowej.



Jak dotąd scharakteryzowano już wiele związków o takich właściwościach; jednak mechanizm ich odmiennego działania nie zostało dostatecznie poznany. Dlatego też, tak obszerna i dobrze udokumentowana praca świetnie wpisuje się w najnowsze trendy badań nad witaminą D i uzupełnia naszą wiedzę na temat jej plejotropowego działania, dostarczając szereg ciekawych informacji.

*b) ocena uzyskanych rezultatów*

Rozprawa doktorska Pani mgr Klaudii Berkowskiej oparta została o dobrze zaplanowane badania polegające na obserwacji efektów biologicznych nowych pochodnych witaminy D, zsyntezowanych przez zespół **prof. dr hab. Andrzeja Kutnera** w Instytucie Farmaceutycznym (Warszawa, Polska) oraz **prof. dr hab. Rafała Sicińskiego** z Wydziału Chemicznego, Uniwersytetu Warszawskiego (Warszawa, Polska). Dodatkowo, scharakteryzowano również aktywność pochodnych kwasu litocholowego zsyntetyzowanych na Wydziale Chemii Organicznej Uniwersytetu Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Hiszpania): przez zespół **prof. Antonio Mouriño**.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań, należy wymienić:

1. Wykazanie, że modyfikacja w obrębie pierścienia A (C-2) prowadzi zazwyczaj do obniżenia powinowactwa pochodnych witaminy D do receptora VDR oraz obniżenia aktywności analogów witaminy D. Natomiast, wydłużenie łańcuch boczny, ale bez jego rozbudowy nie wpływa znacząco na powinowactwo do receptora.
2. Wykazanie, że analogi serii PRI, posiadające modyfikacje 19-*nor*, a w szczególności PRI-5106, wykazują znaczną aktywność biologiczną.
3. Wykazanie, że wyniki dokowania *in silico* nie pokrywają się z danymi doświadczalnymi wiązania analogów do receptora VDR.
4. Wykazanie, że wśród analogów kwasu litocholowego (seria SUNIL), tylko SUNIL-1 wykazywał znaczne powinowactwo do receptora VDR oraz aktywność biologiczną.
5. Wykazanie, korelacji między ekspresją genu *CYP24A1*, a aktywnością biologiczną analogów z serii PRI, w tym indukcją ekspresji genu *TRPV6*.
6. Nie stwierdzono natomiast korelacji między siłą wiązania badanych analogów do receptora VDR, a ich aktywnością biologiczną.

Wnikliwa analiza przedstawionych wyników skłania mnie do zadania paru pytań oraz sformułowania sugestii do dalszych badań.

1. Generalnie, zastanawiam się, czy potrzebna była tak wnikliwa analiza statystyczna danych, szczególnie tych, które na pierwszy rzut oka nie wykazywały znamienności statystycznej.
2. Jeśli chodzi, o badania indukcji ekspresji genu *CYP24A1* metodą RT-PCR, to czy zbadano ilościowo poziom wyjściowy transkryptów w różnych liniach? W normalnych warunkach ekspresja genu *CYP24A1* jest bardzo niewielka (na granicy detekcji). W przypadku takich komórek inkubacja z 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> skutkuje, indukcją rzędu tysięcy razy lub więcej.



Natomiast w komórkach o wysokiej wyjściowej ekspresji *CYP24A1*, indukcja może być bardzo niewielka (być może tak jest w przypadku linii HEK-293-FRT). Dlatego też, gen *CYP24A1*, być może nie był najlepszym markerem do porównywania aktywności analogów witamin D w klonach z delecją (mutacją) *LRP2*. Prawdopodobnie również dlatego pomimo zastosowania skomplikowanej i rozbudowanej analizy statystycznej nie udało się wykazać wpływu megaliny, kodowanej właśnie przez gen *LRP2*, na aktywność pochodnych.

3. Dlaczego, od razu, po wstępnej analizie nie zdecydowano się zsekwencjonować wybranych klonów potencjalnie niosących delecję genu *LRP2*? Sama analiza przy wykorzystaniu specyficznych primerów oraz techniki RT-PCR, czy zastosowanie nukleazy jest bardzo ciekawa z uwagi na metodologię, jednak niestety nie przyniosła oczekiwanych rezultatów.
4. Wydaje mi się, że określenie poziomu białek (*CYP24A1*, czy *TRPV5* i *TRPV6*) ułatwiłoby interpretację wyników ekspresji badanych genów.
5. W pracy (w dyskusji) zabrakło trochę, całościowego porównania badanych związków. Brakuje odpowiedzi na pytania: który z badanych związków wykazywał najwyższą aktywność, czy mógłby być zastosowany w terapii i dlaczego? Takiego podsumowania wyników brakuje również w streszczeniu.

Oceniając, całościowo uzyskane wyniki należy podkreślić ogromną ilość wykonanych oznaczeń, a zamieszczone powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają zasług doktorantki oraz wkładu w rozwój dziedziny. Natomiast, przedstawione do oceny wyniki badań można podsumować stwierdzeniem, że oprócz samej struktury związków, kluczową rolę w ich funkcji biologicznej mogą odgrywać nie do końca poznane czynniki wewnątrzkomórkowe, które warunkują, albo modelują odpowiedź na witaminę D i jej pochodne.

c) *poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.*

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, co jest szczególnie godne pochwały, jeśli weźmiemy pod uwagę obszerność dzieła (249 stron!). Z uwagi na funkcję recenzenta chciałbym zapytać tylko o jedną kwestię (strona 205), co autorka miała na myśli pisząc, „że dalsze badania kliniczne nie są zadawalające”?

2) *Ocena metodologiczna*

a) *dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł*

**Praca Pani mgr Klaudii Berkowskiej** zawiera imponującą ilość 301 dobrze dobranych odnośników literaturowych. Troszkę szkoda, że najnowszych prac (z ostatnich 5 lat) jest stosunkowo niewiele. Zdaje sobie sprawę, że praca jest bardzo rozbudowana, ale trochę brakuje mi omówienia naturalnych metabolitów witamin D, takich jak na przykład 3-epi-25(OH)D, czy też pochodnych 20(OH)D. Warto się zapoznać z dokonaniem na tym polu Prof. Andrzeja Słomińskiego (UAB, Alabama, USA), czy Prof. Roberta Tuckay`a z Perth (The University of Western Australia, Australia). Na przykład, prace dotyczące aktywności pochodnych 7-dehydrocholesterolu czy lumisterolu byłyby przydatne do dyskusji dotyczącej kwasu litocholowego.



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

Podjęta tematyka jest jak najbardziej aktualna, nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z praktycznego, coraz więcej się mówi o antynowotworowym działaniu witaminy D, nie tylko w profilaktyce, ale również w terapii. Hiperkalcemia jest jednym z głównych powodów, dla których stosowano dużych dawek witaminy D w terapii było ograniczone. Jednak szereg badań naukowych wskazuje, że witamina D niekoniecznie jest głównym czynnikiem wywołującym hiperkalcemię. Na przykład długotrwałe leczenie wysokimi dawkami witaminy D (10000 IU dziennie przez wiele miesięcy) stosuje się z powodzeniem w leczeniu łuszczycy. Być może więc, również inne czynniki przyczyniają się do rozwoju zależnej od witaminy D hiperkalcemii. Natomiast badanie pochodnych witaminy D, nie tylko służy do znalezienia nowych związków o niskim wpływie na poziom wapnia, o porównywalnych do  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  własnościach przeciwnowotworowych, ale również do zbadania mechanizmów aktywowanych przez pochodne. Mgr Klaudia Berkowska formułuje 5 dość szczegółowych celów, które można uprościć do pytania o molekularne podłoże aktywności biologicznej pochodnych witaminy D.

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

Na szczególną uwagę zasługuje wykonanie oznaczeń dla ponad 20 nowych pochodnych witamin D oraz kwasu litocholowego, zsyntezowanych w 3 wiodących ośrodkach w kraju i zagranicą. Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz technik laboratoryjnych, w tym: zbadała wiązanie pochodnych do receptora VDR; indukcję różnicowania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; akumulację jądrową białka VDR metodą Western blot; aktywność szlaku MAPK przy pomocy techniki Western blot; oraz ekspresję genów z zastosowaniem techniki RT-PCR. Co istotne, badania wykonano na kilku modelach komórkowych, w tym: komórkach linii ostrej białaczki promielocytowej (HL-60); linii HEK293-FRT (Flp-InTM 293), uzyskanej z linii HEK293 (embrionalne ludzkie komórki nerek); linii komórkowej gruczołakoraka jelita grubego (HT-29); oraz komórkach U-2-OS – linii komórkowej kostniakomięsaka. Godne uwagi jest również, samodzielne wykonanie nokautu genu *LRP2* w komórkach HEK293-FRT (Flp-InTM 293) oraz wnikliwa analiza uzyskanych klonów. Również opracowanie statystyczne uzyskanych wyników jest bardzo rozbudowane, co świadczy o tym, że doktorantka nie tylko jest biegła w pracy laboratoryjnej, ale również świetnie radzi sobie ze skomplikowaną analizą statystyczną.

Praca jest bardzo obszerna i bardzo dobrze udokumentowana, jednak, uwagi na funkcję recenzenta mam kilka pytań i uwag dotyczących metodologii oraz prezentowania wyników:

- Wydaje mi się, że część odpisów metod np. analiz statystycznych; tworzenia nokautu genu *LPR2* oraz analizy klonów, które umieszczone są w wynikach, mogłaby się znaleźć w metodach.
- W badaniach wpływu analogów witaminy D na ekspresję markerów różnicowania, część wykresów skazuje, że najprawdopodobniej stężenie badanych związków było zbyt niskie, aby osiągnąć maksymalną aktywację, co w zasadzie uniemożliwia obliczenie  $\text{EC}_{50}$  (np. Rysunek 6.10, dolny panel, PRI-5105 i PRI-5106; Rysunek 6.14, dolny panel, PB-25S)
- Czy w doświadczeniach przedstawionych na Rysunku 6.17, wykonano również, oznaczenie czystości frakcji, na przykład z wykorzystaniem białka jądrowego jako markera?



Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Klaudia Berkowskiej oraz jej dociekliwość w prowadzeniu badań naukowych.**

*d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.*

Praca ma klasyczny układ, zawiera bardzo dokładny spis treści oraz skrótów; po którym znajduje się streszczenie, w języku polskim i angielskim. Bardzo obszerny wstęp obejmujący 76 stron maszynopisu, systematycznie wprowadza czytelnika w tematykę witaminy D, poczynając od jej syntezy i metabolizmu. W dalszej części, scharakteryzowane są wewnątrzkomórkowe szlaki aktywowane przez witaminę D, a następnie rola oraz mechanizm działania witaminy D w różnych tkankach i komórkach. Na zakończenie omówione są modyfikacje i analogi witaminy D wraz z charakterystyką ich aktywności biologicznej. Rozdział sam w sobie, mógłby stanowić oddzielną pracę przeglądową lub podręcznik o witaminie D.

Rozprawa doktorska **Pani mgr Klaudia Berkowska** opiera się na hipotezie badawczej przedstawionej w postaci 5 celów, a raczej spójnych tematycznie pytań badawczych. Kolejny rozdział opisuje bardzo drobiazgowo materiały i metody. Co nieco dziwne, struktura i charakterystyka badanych związków omówiona jest we wstępie. Następny rozdział to opis rezultatów, w których doktorantka systematycznie i w sposób logiczny przedstawia uzyskane wyniki, które omawiane w oparciu o metodologię badań, z podziałem na poszczególnych grup związków. Z jednej strony takie podejście umożliwia porównanie np. siły wiązania analogów witaminy D do receptora, ale utrudnia całościową charakterystykę poszczególnych związków. Dlatego, też ważną częścią wyników jest analiza statystyczna, w tym badania korelacji np. pomiędzy powinowactwem wiązania, a indukcją różnicowania komórek linii HL-60.

Dyskusja, w znacznej części, opiera się na omówieniu wyników i zawiera tylko 13 nowych cytacji. Należy jednak podkreślić, że sama praca, jak już to było wspomniane powyżej, posiada bardzo rozbudowany wstęp i aż 301 odnośników literaturowych, co świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury oraz umiejętnym jej wykorzystaniu. Co ciekawe, z wnikliwej lektury dyskusji, możemy dowiedzieć się, że spora część prezentowanych wyników została już opublikowana. Szkoda, więc, że nie udało się przygotować rozprawy w oparciu o publikacje. Nie ma jednak wątpliwości, że praca została przygotowana bardzo starannie, w języku polskim, a Pani mgr Klaudia Berkowska uniknęła szeregu częstych błędów językowych, literówek oraz stosowania żargonu laboratoryjnego, który pojawia się w tego typu opracowaniach.

Przy tak obszernej pracy, trudno jest mówić o brakach, ale wydaje mi się, że dyskusja mogłaby zwierać rysunkowe podsumowanie uzyskanych wyników, pokazujące badane modyfikacje strukturalne oraz ich wpływ na aktywności analogów witaminy D. Szkoda, też, że autorka nie podjęła próby uszeregowania badanych analogów i wybrania najlepszych oraz porównania ich aktywności do związków uzyskanych przez inne zespoły badawcze. Przy okazji rodzi się pytanie, co dalej z analogami, jakie są plany badawcze?

**Chciałbym podkreślić, że wszystkie sugestie i uwagi zawarte w przedstawionej recenzji, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań doktorantki oraz wartości poznawczej prezentowanych wyników.**

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, monografia Pani mgr Klaudia Berkowskiej zawiera drobiazgową charakterystykę imponujące grupy analogów witaminy D, przy wykorzystaniu różnorodnych technik oraz modeli komórkowych. Na szczególne wyróżnienie zasługuje świetna znajomość metod statystycznych, oraz ich umiejętne zastosowanie. Nie mam, więc wątpliwości, że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani Klaudii Berkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Histologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
prof. dr hab. n. med. Michał Żmijewski  
  
Kierownik

Gdańsk, dnia 10.10.2023

Prof. dr hab. Michał Żmijewski