



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

dr hab. n. med. Anna A. Brożyna, prof. UMK  
Katedra Biologii Człowieka  
Instytut Biologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Lwowska 1  
87-100 Toruń  
e-mail: anna.brozyna@umk.pl

Toruń, 15.01.2021r.

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Nowak**  
**z tytułowanej „Współdziałanie receptora witaminy D (VDR) z receptorami kwasu**  
**retinowego (RAR) w procesie hematopoezy”**  
**wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii**  
**Uniwersytetu Wrocławskiego**  
**pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej**

### **1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji**

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska Pani mgr Urszuli Nowak, pt. „Współdziałanie receptora witaminy D (VDR) z receptorami kwasu retinowego (RAR) w procesie hematopoezy”. Promotorem rozprawy jest Pani hab. med. Ewa Marcinkowska.

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 3 listopada 2020r. (WB.402.2.2019/2020.VT) Pana Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, dr hab. inż. Marcina Kadeja, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Nowak, w oparciu o uchwałę Nr 69/2020 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego.

Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z dnia 27 września 2017 poz. 1789). Za przesłanki oceny końcowej przyjęto następujące kryteria: sformułowanie problemu badawczego i tematu rozprawy, cele i hipotezy badawcze, metodyka badań, układ treści, ocena merytoryczna i formalna pracy oraz opinia recenzentki o treści rozprawy.

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Instytut Biologii,  
Katedra Biologii Człowieka,

ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń, Polska, tel. +48 56 611 45 99, +48 56 611 47 85, fax +48 56 611 47 85

Kierownik: dr hab. Anna A. Brożyna, prof. UMK

## 2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma konwencjonalny oraz logiczny układ i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim o charakterze eksperymentalnym. Została napisana klarownym i poprawnym językiem. W większości rozdziałów wydzielono liczne, trafne z merytorycznego punktu widzenia, podrozdziały. Rozprawa liczy 159 stron i składa się z następujących rozdziałów: Streszczenia, Wstępu, Hipotez badawczych, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Literatury, z których część została podzielona dodatkowo na podrozdziały. Zamieszczono również: wykaz używanych skrótów, informacje o źródłach finansowania badań oraz opublikowanych przez Doktorantkę artykułach, wykaz rycin i tabel oraz suplement, co ułatwia lekturę pracy oraz wzbogaca ją o opis dodatkowych wyników.

**Wstęp** liczy 39 stron i jest przeglądem literatury związanej z zagadnieniami poruszonymi w pracy. Rozdział ten jest stosunkowo obszerny, bardzo dobrze napisany od strony merytorycznej, jak i stylistycznej i pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Rozdział ten wzbogacony został poprzez 4 tabele i 16 rycin.

Jako osobny rozdział wyodrębniono **Hipotezy badawcze**, które zakładają, że receptor VDR ulega ekspresji i jest aktywny w prawidłowych komórkach krwi różnicujących się oraz w komórkach całkowicie zróżnicowanych, a receptor RAR reguluje transkrypcję VDR w komórkach hematopoetycznych. Podejmowana tematyka badawcza jest ważna z punktu widzenia zrozumienia potencjału terapeutycznego witaminy D w leczeniu białaczek oraz molekularnego mechanizmu tego działania.

Rozdział **Materiały** został podzielony na 3 podrozdziały i zawiera opis zastosowanych związków, użytych przeciwciał, czynników wzrostu i innych odczynników, buforów i zestawy odczynnikowe. Ponadto zawiera charakterystykę użytych linii komórkowych i ludzkich prawidłowych komórek krwi, a także opis użytych w badaniach urządzeń laboratoryjnych oraz stosowanego specjalistycznego oprogramowania. Rozdział **Materiał** został podzielony na 3 podrozdziały i zawiera opis stosowanych technik. Do realizacji postawionych celów badawczych użyto wielu zarówno tradycyjnych jak i nowoczesnych metod eksperymentalnych, w tym technik opartych na ustalonych liniach komórkowych oraz

hodowlach pierwotnych, techniki biologii molekularnej, takie jak oznaczanie żywotności, immunofenotypowanie przy użyciu cytometrii przepływowej, zagnieżdżony PCR czy sekwencjonowanie. Wszystkie metody zostały zastosowane prawidłowo. Rozdziały zawierają, odpowiednio, 9 i 12 tabel.

W rozdziale **Wyniki**, obejmującym 29 stron i podzielonym na tematyczne podrozdziały, Doktorantka dokonała omówienia rezultatów wyników przeprowadzonych badań dotyczących analizy zmiany ekspresji receptorów VDR i RAR po stymulacji przez retinoidy, mechanizmu wyciszania genu VDR, analizy kopii genów VDR, CYP24A1 i CYP26A1 po stymulacji 1,25(OH)2D2 i retinoidami. W rozdziale tym zamieszczono 17 rycin i 2 tabele.

Po rozdziale prezentującym uzyskane wyniki Doktorantka zamieściła **Dyskusję**, liczącą 15 stron, stanowiącą omówienie i interpretację uzyskanych wyników w świetle dostępnej literatury naukowej z tego zakresu tematycznego.

W rozdziale zatytułowanym **Wnioski** Autorka zamieściła 5 wniosków wynikających z przeprowadzonych badań naukowych.

**Bibliografia** obejmuje 367 anglojęzycznych pozycji piśmiennictwa. Pod względem formalnym i merytorycznym są one na ogół cytowane właściwie.

### **3. Ocena merytoryczna zawartości rozprawy**

Aktywna forma witaminy D3 (1,2-dihydroksywitaminy D3, 1,25(OH)2D3 wykazuje plejotropowe i wielonarządowe działanie działając poprzez receptor jądrowe dla witaminy D (VDR) na ekspresję szeregu genów zaangażowanych w różnorodne procesy. 1,25(OH)2D3 jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania m.in. układu odpornościowego. Wieloetapowy i hierarchiczny proces hematopoezy wymaga precyzyjnej regulacji poprzez liczne czynniki transkrypcyjne, w tym jądrowy receptor dla kwasu retinowego (RAR). Zaburzenia procesu hematopoezy może skutkować powstaniem chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, w tym białaczek. Mimo postępu w terapiach ostrej białaczki szpikowej (AML) wciąż poszukuje się nowych rozwiązań o większej skuteczności i zmniejszających śmiertelność pacjentów z AML. Jednym z rozwiązań jest terapia różnicująca, oparta na atRA, a 1,25(OH)2D3 jest nowym związkiem mogącym promować różnicowanie

komórek AML, a tym samym zwiększającym antybiałaczkowy potencjał tej terapii. W przedstawionej pracy Doktorantka podjęła próby określenia ekspresji VDR i RAR oraz jego aktywności w prawidłowych różnicujących się komórkach krwi, określenia regulacyjnego potencjału ekspresji VDR przez RAR i atRA oraz zbadania mechanizmu opartego o metylację/demetylację wyciszania VDR.

W pierwszej części rozprawy Doktorantka wyczerpująco omówiła modele hematopoezy, charakterystykę niszy krwiotwórczych komórek macierzystych oraz czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces hematopoezy. Ponadto scharakteryzowała ostre białaczki szpikowe: ich patofizjologię, klasyfikację, diagnostykę oraz terapie zarówno klasyczne jak i nowe, wskazując na problem niskiej skuteczności proponowanych podejść terapeutycznych oraz na potencjalne przeciwnowotworowe działanie kwasu całkowicie-*trans*-retinowego (arRA) oraz 1,25(OH)2D3. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawiła źródła witaminy D i metabolizm tej witaminy. Omówiła także organizację genu VDR oraz strukturę receptora VDR. Dostyc szczegółowo opisano zostało genomowe działanie 1,25(OH)2D3, w tym mechanizm działania receptorów jądrowych VDR i RXR, wpływ witaminy D3 na układ immunologiczny i jego antynowotworowe działanie oraz wpływ na hematopoezę. Doktorantka w podobny sposób scharakteryzowała witaminę A, mechanizm jej działania z udziałem receptorów RAR i RXR. Pani mgr Urszula Nowak szczególną uwagę skupiła na ich wpływie na hematopoezę. Wstęp kończy się podrozdziałami przedstawiającymi współdziałanie 1,25(OH)2D3 i atRA oraz ogólną charakterystykę zagadnienia regulacji epigenetycznej. Tak obszerny wstęp jest niezbędny ze względu na złożoność mechanizmów hematopoezy i procesów ją regulujących, szerokie spektrum działania atRA i 1,25(OH)2D3 oraz zagadnień związanych z biologią białaczek, ich klasyfikacją kliniczno-patomorfologiczną i schematami leczenia chorób hematoonkologicznych. Jednocześnie wskazuje na potrzebę badań w podejmowanej tematyce.

W ocenie rozprawy naukowej najważniejszy jest oryginalny problem naukowy oraz jak problem ten został rozwiązany. Postawioną hipotezę badawczą Doktorantka weryfikowała rozwiązując 3 główne zagadnienia, które obejmowały:

- 1) regulację VDR przez retinoidy poprzez:

-analizę ekspresji VDR i wariantów transkrypcyjnych VDR przez retinoidy w prawidłowych komórkach krwi na różnych etapach hematopoezy

-ocenę aktywności VDR i RAR w prawidłowych komórkach krwi na różnych etapach hematopoezy i komórkach progenitorowych

-analizę ekspresji VDR w komórkach progenitorowych

2) badanie mechanizmu wyciszenia genu VDR poprzez:

-badanie metylacji DNA w regionie promotorowym VDR

-możliwości regulacji metylacji w komórkach białaczkowych poprzez związki hipometylujące oraz 1,25(OH)2D3 i atRA

-wpływ inhibitorów metylotransferaz na ekspresję genu VDR i VDR1C

3) analizę zmiany liczby kopii genów VDR, CP24A1 i CYP26A1 po stymulacji 1,25(OH)2D3 i atRA.

Mnogość technik badawczych zastosowanych przez Doktorantkę oraz biegłość w ich interpretacji budzą uznanie. Stanowią również o spójności całego, starannie zaplanowanego eksperymentu badawczego.

Uważam, że Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy zaliczyć wykazanie:

- ekspresji VDR w komórkach krwi u ludzi

- regulacyjnego działania atRA na ekspresję VDR, w tym zróżnicowanej ekspresji VDR po stymulacji atRA i 1,25(OH)2D3 w zależności od poziomu zróżnicowania komórek krwi

- aktywności białka VDR w komórkach krwi na różnych poziomach hematopoezy

- spadku aktywności RAR w trakcie hematopoezy

- braku zaangażowania mechanizmów metylacji/demetylacji w regulacji ekspresji VDR.

W Dyskusji Autorka odnosząc się do uzyskanych przez siebie wyników badań przedstawia ich własną interpretację, analizując je na tle doniesień innych autorów. Dyskutowane są zagadnienia związane z regulacją ekspresji VDR, jego aktywności po

stymulacji 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i/lub atRA oraz wyniki dotyczące mechanizmu wyciszenia ekspresji VDR opartego na metylacji/demetylacji. Cennym wzbogaceniem dyskusji są ryciny przedstawiające autoregulację VDR przez 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz ekspresję CYP26A1 i CYP24A1 w komórkach myszy, a także porównanie regulacji VDR w komórkach mysich i ludzkich.

Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi niewątpliwie nowe informacje na temat możliwości regulacji hematopoezy zarówno przez 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jak i atRA.

#### **4. Spostrzeżenia oraz uwagi krytyczne i redakcyjne**

W trakcie lektury rozprawy pracy zrodziło się u mnie kilka pytań, wątpliwości i komentarzy, co do, których chciałabym poznać stanowisko Doktorantki.

1. Czy Doktorantka obserwowała korelację pomiędzy metylacją promotora VDR1c a rokowaniem u pacjentów z białaczką? Zdaję sobie sprawę, że włączono tylko 10 pacjentów i istotność statystyczna mogła nie zostać osiągnięta, jednak być może udałoby się zaobserwować trendy, które mogłyby wskazać np.: pewne nowe kierunki badań.

2. Czy dane pokazane na Ryc. 7.12 i Ryc. 7.13 zawierają dane nieróżniące się statystycznie istotnie? Wprawdzie Doktorantka zaznacza, że ekspresja VDR i VDR1c była na podobnym poziomie, jednak poziom ekspresji pokazany wysokością słupków w niektórych przypadkach różni się znacznie.

3. Zabrakło dyskusji z wynikami dotyczącymi zmiany liczby kopii genów CYP24A1, CYP26A1 oraz VDR po stymulacji 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz atRA. Jaki może być mechanizm tego procesu? Zabrakło również dyskusji wyników pokazujących mniejszą zmianę w licznie tych genów po stymulacji 1,2(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i atRA nie po stymulacji samą 1,2(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

4. Doktorantka wspominała we Wstępie o pochodnych witaminy D, jednak to zagadnienie nie zostało szerzej przybliżone, nawet w kontekście potencjalnego antybiałaczkowego działania naturalnych i syntetycznych pochodnych witaminy. Byłoby to interesujące, zwłaszcza, że część tych związków wykazuje działanie promujące różnicowanie komórek.

5. Nie został jasno określony cel badawczy. Oczywiście po lekturze dysertacji ten cel można wskazać, jednak powinien on również zostać wskazany przez Doktorantkę.
6. Zabrakło charakterystyki pacjentów z białaczką, od których pozyskano materiał badawczy do niniejszego projektu a także informacji o przebiegu ciąży, czasie jej trwania itp.
7. Dane zawarte w rozdziale Wnioski mają raczej charakter podsumowania uzyskanych wyników niż wniosków. Natomiast brakuje wniosków.

Z obowiązku recenzenta muszę także wspomnieć o błędach edytorskich, np.: opis innych wyników niż prezentowanych na Ryc. 7.9 i 7.10, błędy literowe, umieszczenie podpisów do niektórych rycin na innej stronie niż rycina, brak objaśnienia skrótów na Ryc. 3.1, drobne błędy stylistyczno-gramatyczne, które jednak nie wpływają na pozytywną ocenę całości dysertacji.

## **5. Podsumowanie**

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, a uzyskane wyniki umiejętnie przeanalizowane i przekonująco przedstawione. Na podkreślenie i uznanie zasługuje różnorodność metod badawczych zastosowanych i opanowanych przez Doktorantkę. W efekcie postawione hipotezy badawcze zostały zweryfikowane, a zaplanowane cele osiągnięte, co zaowocowało opublikowaniem wyników badań w dwóch oryginalnych artykułach w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, o łącznym wskaźniku IF=8,922 oraz 280 punktach MNiSW. Chciałabym również zwrócić uwagę na zespół, w którym pracuje Pani mgr Urszula Nowak, kierowany jest przez prof. dr hab. Ewę Marcinkowską. Zespół ten od wielu lat konsekwentnie prowadzi badania nad mechanizmem regulacji różnicowania komórek przez receptory jądrowe VDR i RAR, a także antynowotworowymi właściwościami witaminy D i jej analogów oraz kwasu retinowego. Badania te prowadzone są w szeroko rozwiniętej współpracy krajowej i międzynarodowej, co wpływa na wysoką jakość prowadzonych prac. Mam nadzieję, że badania te będą

kontynuowane i pochodne witaminy D pozbawione właściwości hiperkalcemicznych o właściwościach antybiałaczkowych także będą wykazywały działanie promujące różnicowanie, tym samym zwiększając możliwości terapeutyczne u pacjentów z białaczką.

## 6. Wniosek końcowy

Wysoko oceniam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oraz stwierdzam, że dysertacja doktorska Pani mgr Urszuli Nowak, pt. „Współdziałanie receptora witaminy D (VDR) z receptorami kwasu retinowego (RAR) w procesie hematopoezy” stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi do badań nad wpływem witaminy D3 i kwasu retinowego na różne etapy hematopoezy wiele nowych aspektów poznawczych. Praca jest poprawnie technicznie przygotowana a jej estetyka nie budzi zastrzeżeń.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoki w mojej ocenie poziom przedstawionej dysertacji, **wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o nagrodzenie Pani mgr Urszuli Nowak.**

Kierownik  
Katedra Biologii Człowieka  
*Brozy me*  
dr hab. Anna Brożyna, prof. UMK  
tel. 56 611 45 99