



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

KRAKÓW, 13 STYCZNIA 2026

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

DR HAB. ALEKSANDER GRABIEC, PROF. UJ

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Sitko
pt. „Rola białka Hsp90 w atopowym zapaleniu skóry”
zrealizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Stefana Tukaja
w Pracowni Immunologii Komórkowej i Molekularnej Wydziału Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego**

Na wstępie chciałbym zaznaczyć, że ocena rozprawy doktorskiej złożonej z serii artykułów naukowych stanowi szczególne wyzwanie, ponieważ wymaga ponownej oceny prac, które przeszły już rygorystyczny proces recenzji w specjalistycznych czasopismach naukowych. Gdy artykuły publikowane są w uznanych międzynarodowych czasopismach, ich wartość merytoryczna oraz jakość metodologiczna zazwyczaj nie podlegają dyskusji. Tak właśnie jest w przypadku rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Sitko. W związku z tym moja recenzja będzie dotyczyć przede wszystkim oceny spójności zbioru artykułów jako jednolitej rozprawy doktorskiej. Przedstawione przeze mnie komentarze i pytania będą koncentrować się głównie na kwestiach, które mogą pomóc w dalszym rozwijaniu wyników zaprezentowanych w rozprawie. Z kolei uwagi krytyczne należy traktować jako wskazówki, które mogą okazać się pomocne w przyszłych badaniach realizowanych przez Doktoranta oraz w opracowywaniu publikacji opisujących ich wyniki.

Rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Sitko ma formę cyklu publikacji i obejmuje cztery spójne tematycznie artykuły oryginalne oraz jeden artykuł poglądowy. Pracom tym towarzyszy wyczerpujące wprowadzenie, jasno sformułowane cele badawcze oraz syntetyczne omówienie wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, zakończone podsumowaniem całości. Integralną częścią rozprawy są również oświadczenia współautorów, jednoznacznie potwierdzające wiodącą rolę Doktoranta we wszystkich uwzględnionych publikacjach. Prace naukowe wchodzące w skład rozprawy zostały zrealizowane w ramach grantu OPUS zatytułowanego „Rola białka szoku termicznego Hsp90 w atopowym zapaleniu skóry” przyznanego prof. dr hab. Stefanowi Tukajowi. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że rozprawa obejmuje aż cztery prace oryginalne, w których Doktorant występuje jako pierwszy autor. Tak duża liczba publikacji składających się na rozprawę doktorską jest rzadko spotykana

UL. GRONOSTAJOWA 7
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 (12) 664 65 40
EMAIL: ALEKSANDER.GRABIEC@UJ.EDU.PL

w biologii doświadczalnej, a znaczenia tego osiągnięcia nie umniejsza fakt, iż dwie z nich mają formę krótkich doniesień.

Przedstawiona rozprawa poświęcona jest analizie roli białka HSP90 w patogenezie atopowego zapalenia skóry (AZS) oraz ocenie potencjału terapeutycznego inhibitorów HSP90 (STA-9090 oraz 17-AAG), z wykorzystaniem zarówno badań *in vitro* komórek pochodzących od pacjentów i linii komórkowej keratynocytów, jak i mysiego modelu choroby. Tak szeroki zakres analiz oraz wynikająca z niego różnorodność zastosowanych technik i strategii eksperymentalnych stanowią modelowy przykład nowoczesnych badań z zakresu biologii translacyjnej, ukierunkowanych na łączenie badań podstawowych prowadzonych na poziomie molekularnym i komórkowym z praktyką kliniczną oraz potencjalnymi zastosowaniami praktycznymi. W przypadku rozprawy mgr Krzysztofa Sitko obserwacje kliniczne dotyczące podwyższonego poziomu zewnątrzkomórkowego białka HSP90 α (eHSP90 α) oraz obecności przeciwciał IgE anty-HSP90 α stanowią punkt wyjścia do badań *in vivo*, analizujących wpływ blokowania aktywności HSP90 na procesy zapalne charakterystyczne dla patogenezy AZS.

Spójność tematyczna cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy nie budzi wątpliwości. Publikacja 1, mająca charakter pracy poglądowej, w sposób rozbudowany i wyczerpujący przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący roli białek HSP70 i HSP90 w autoimmunologicznych chorobach skóry, nakreślając teoretyczne podstawy badań realizowanych przez Doktoranta oraz uzasadniając potrzebę zastosowania badań funkcjonalnych i zwierzęcych modeli choroby w celu precyzyjnego scharakteryzowania udziału tych białek w patogenezie omawianych schorzeń. Następnie, w publikacjach 2 i 3, Doktorant przeprowadził analizę stężenia eHSP90 α w surowicy pacjentów z AZS, porównując je zarówno z grupami kontrolnymi, jak i m.in. z pacjentami z opryszczkowym zapaleniem skóry. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną swoistość eHSP90 α jako biomarkera AZS. Obserwacje te, sugerujące zaburzenia funkcji białka HSP90 w przebiegu AZS, stanowiły punkt wyjścia do badań *in vivo* nad wpływem hamowania aktywności HSP90 w mysim modelu tej choroby, których wyniki zostały przedstawione w publikacjach 4 i 5. Badania te wykazały, że blokowanie HSP90 prowadzi do modulacji szerokiego spektrum procesów zapalnych, co może mieć korzystne znaczenie w kontekście patogenezy AZS.

Choć niniejsze skrótowe podsumowanie wyników czterech publikacji oryginalnych uwzględnionych w rozprawie nie oddaje w pełni zakresu analiz przeprowadzonych przez Doktoranta, jednoznacznie ukazuje spójność koncepcji badawczej oraz konsekwentnie realizowaną sekwencję badań prowadzącą od analiz próbek klinicznych o charakterze opisowym i korelacyjnym do doświadczeń funkcjonalnych, wskazujących na potencjał inhibitorów HSP90 w modulowaniu procesów zapalnych w skórze dotkniętej AZS.

Niezależnie od wysokiej oceny merytorycznej publikacji składających się na rozprawę, a także w celu pogłębienia i poszerzenia zawartej w niej dyskusji, proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do poniższych uwag krytycznych oraz o udzielenie odpowiedzi na pytania, które nasuwają się po lekturze rozprawy:

- 1) W publikacjach 2 (*Cell Stress and Chaperones* 2021) oraz 3 (*Frontiers in Medicine* 2024) przedstawiono wyniki analizy stężeń białka eHSP90 α w surowicy pacjentów z AZS (ryc. 1 w obu publikacjach). Choć wyniki zaprezentowano jako analizy niezależnych kohort pacjentów różniących się liczebnością ($n = 29$ vs $n = 31$), uwagę zwraca bardzo podobna dystrybucja punktów odpowiadających wysokim stężeniom HSP90 na obu wykresach. W związku z tym proszę Doktoranta o doprecyzowanie, czy analizowane kohorty były w pełni niezależne, czy też dotyczyły niezależnych pomiarów próbek pochodzących z kohort częściowo się pokrywających. Alternatywnie, czy w obu publikacjach częściowo wykorzystano te same wyniki, które posłużyły do odrębnych porównań z innymi grupami kontrolnymi lub badanymi. Taka praktyka jest oczywiście dopuszczalna, jednak ponowne wykorzystanie danych w kolejnej publikacji powinno być jasno zaznaczone i odpowiednio doprecyzowane w tekście. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie tej kwestii.
- 2) W publikacji 5 (*Scientific Reports* 2025) zbadano zmiany poziomu acetylacji HSP90 jako wskaźnik aktywności tego białka. W moim odczuciu zarówno w tej publikacji, jak i w pozostałych częściach rozprawy brakuje pogłębionej dyskusji tego interesującego zjawiska. W związku z tym proszę Doktoranta o rozwinięcie kilku kwestii dotyczących tego zagadnienia, w szczególności:
 - a. na jakiej podstawie zdecydowano się na analizę wyłącznie zmian w acetylacji HSP90, spośród wielu modyfikacji potranslacyjnych wpływających na aktywność tego białka?
 - b. w jaki sposób 17-AAG może wpływać na regulację acetylacji HSP90?
 - c. w kontekście przedstawionych w publikacjach 2 i 3 zmian poziomu białka eHSP90 w surowicy pacjentów z AZS – czy oznaczenie poziomu acetylacji eHSP90 występującego w surowicy mogłoby mieć znaczenie biologiczne lub diagnostyczne?
 - d. jakie białka regulują poziom acetylacji HSP90? Czy dostępne są dane literaturowe dotyczące zaburzeń funkcji tych białek w AZS? Czy pośrednia modulacja aktywności HSP90 poprzez inhibicję enzymów regulujących acetylację mogłaby stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w AZS?
- 3) W doświadczeniach na linii komórkowej keratynocytów HaCaT zaprezentowanych w publikacji 5 (*Scientific Reports* 2025) zbadano wpływ inhibitora HSP90 na komórki poddane równoczesnej stymulacji TNF α i IFN γ . W pracy brakuje jednak uzasadnienia dla wyboru takiego modelu aktywacji keratynocytów. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie, na czym opierał się dobór tej konkretnej kombinacji stymulantów oraz dlaczego nie zdecydowano się na niezależną analizę efektów pojedynczych cytokin, co mogłoby umożliwić rozdzielenie skutków inhibicji HSP90 wynikających z blokowania szlaków NF- κ B i STAT. Ponadto w sekcji metodologicznej wskazano, że obie cytokiny stosowano w stężeniu 10 μ g/ml. Proszę o potwierdzenie, czy wartości te są poprawne. Podane stężenia znacząco przekraczają dawki powszechnie stosowane w doświadczeniach *in vitro*, które zazwyczaj oscylują w zakresie kilkudziesięciu ng/ml.
- 4) Chociaż w dyskusji zawartej w publikacjach 2 i 3 zawarto spekulacje na temat potencjalnej roli podwyższonego poziomu eHSP90 w AZS, związanej m.in. z wpływem na aktywność białek MMP oraz indukcją odpowiedzi humoralnej, w publikacjach opisujących wyniki doświadczeń *in vivo* zabrakło jednak dyskusji dotyczącej możliwego powiązania działania inhibitorów HSP90 ze zmianami stężenia eHSP90 w surowicy. Powstaje zatem pytanie,

czy inhibicja HSP90, zarówno systemowa, jak i miejscowa, może wpływać na wydzielanie eHSP90 do surowicy oraz, jeżeli tak, jakie byłyby tego konsekwencje biologiczne. Czy istnieje techniczna możliwość zmierzenia poziomu eHsp90 w surowicy myszy z indukowanym AZS, traktowanych inhibitorami Hsp90, i czy taki pomiar mógłby dostarczyć istotnych biologicznie informacji? Analogicznie, czy pomiar wydzielania eHSP90 do pożywek hodowlanych przez komórki (keratynocyty lub komórki immunologiczne) poddane stymulacji zapalnej i traktowane inhibitorami HSP90 mógłby dostarczyć istotnych informacji? Proszę Doktoranta o krótkie przedyskutowanie tych kwestii.

Poniżej przedstawiam również kilka uwag krytycznych, które mogą stanowić wskazówkę dla Doktoranta w jego dalszej działalności badawczej, natomiast odniesienie się do tych uwag podczas obrony nie jest konieczne:

- 1) Wobec dużej liczby stosowanych testów statystycznych, dobieranych w zależności od rodzaju analizowanego zestawu danych oraz ich rozkładu, zasadne jest jednoznaczne wskazywanie, które konkretnie testy zostały wykorzystane do analizy danych prezentowanych na poszczególnych rycinach. We większości publikacji Doktorant ogranicza się do ogólnego wyliczenia zastosowanych metod analizy statystycznej w części metodologicznej, natomiast na tej podstawie nie jest możliwa weryfikacja, jakie testy zostały użyte do analizy danych przedstawionych na konkretnych wykresach (w szczególności dotyczy to publikacji zawierających rozbudowane ryciny z wieloma panelami), a tym samym również ocena prawidłowości ich zastosowania.
- 2) Wyniki przedstawione na ryc. 1 i 2 w publikacji 4 (*Cell Stress and Chaperones*, 2023) nie obejmują grupy kontrolnej, w której nie indukowano AZS za pomocą DNCB. Choć porównanie myszy z indukowanym AZS traktowanych inhibitorem HSP90 oraz grupy kontrolnej otrzymującej nośnik (*vehicle control*) jest wystarczające do oceny skuteczności badanego związku w tym modelu, uwzględnienie dodatkowej grupy kontrolnej pozwoliłoby na dokładniejszą ocenę intensywności objawów uzyskanych w danym doświadczeniu oraz na rozstrzygnięcie, czy działanie inhibitora prowadzi do całkowitego zniesienia objawów choroby, czy jedynie do ich częściowego ograniczenia.
- 3) Fragmenty dyskusji w publikacji 5 (*Scientific Reports* 2025) zawierają dosłownie skopiowane, kompletne sekwencje opisu wyników, do których dodano jedynie pojedyncze zdania z odniesieniami do literatury. Jest to szczególnie widoczne w trzecim i piątym akapicie dyskusji, które odnoszą się odpowiednio do doświadczeń *in vitro* oraz analiz mikrobiomu skóry. Z kolei szósty akapit dyskusji stanowi dokładną kopię opisu wyników analiz mikrobiomu jelitowego przedstawionego w sekcji „Topical application of 17-AAG impacts both skin and gut microbiota in a mouse model of atopic dermatitis” i jest pozbawiony jakichkolwiek odniesień do literatury. Choć oczywiste jest, że w dyskusji należy odwoływać się do konkretnych wyników zaprezentowanych w pracy, to jednak odwołania te powinny mieć charakter skrótowy i stanowić punkt wyjścia do ich interpretacji w kontekście dostępnej literatury. Kopiowanie całych fragmentów opisu wyników do sekcji dyskusji nie jest zgodne z powszechnie przyjętymi standardami redakcyjnymi. Przedstawiona uwaga ma przede wszystkim charakter techniczny, ponieważ

pozostałe fragmenty dyskusji w sposób wyczerpujący umiejscawiają uzyskane wyniki w szerszym kontekście badawczym oraz wskazują ich potencjalne ograniczenia.

- 4) Prezentacja wyników analizy western blot przedstawiona w publikacji 5 (*Scientific Reports*, 2025) na ryc. 3d w formie wyciętych zdjęć pojedynczych prążków dla każdego warunku osobno, choć formalnie dopuszczalna, nie jest rozwiązaniem optymalnym. Zamieszczone w suplemencie zdjęcia oryginalnych skanów membran, ilustrujące sposób i kolejność nałożenia próbek, wyjaśniają przyczyny zastosowania takiego zabiegu. Niemniej jednak w takiej sytuacji preferowanym rozwiązaniem jest wykonanie nowych membran z wykorzystaniem wybranych próbek nałożonych w kolejności optymalnej z punktu widzenia prezentacji wyników w publikacji. Ma to szczególne znaczenie w kontekście niskiej jakości zdjęć membran przedstawionych w suplemencie, która sprawia, że jednoznaczne przypisanie prążków zaprezentowanych na ryc. 3d do oryginalnych membran jest bardzo utrudnione.
- 5) Na ryc. 3 oraz ryc. 6 w publikacji 5 (*Scientific Reports*, 2025) brakuje informacji dotyczących liczby powtórzeń eksperymentów (w przypadku doświadczeń prowadzonych na komórkach HaCaT) lub liczby dawców, od których pochodziły analizowane komórki. W sekcji metodologicznej podano co prawda liczbę pacjentów oraz zdrowych dawców, od których pobrano krew do izolacji PBMC/PMN, a także całkowitą liczbę pacjentów z atopowym zapaleniem skóry uwzględnionych w badaniach, jednak nie jest jednoznacznie wskazane, jaka liczba pacjentów lub dawców została faktycznie wykorzystana do analiz przedstawionych w poszczególnych panelach tych rycin.

Wskazane powyżej drobne niedociągnięcia nie wpływają jednak na bardzo wysoką ocenę przedstawionej rozprawy, w której opisano wyniki nowatorskich badań przeprowadzonych z zastosowaniem szerokiego zakresu metod. Co istotne, tematyka pracy dotyczy schorzenia dotykającego dużą grupę pacjentów, którego mechanizmy pozostają nadal nie w pełni poznane, a stosowane strategie terapeutyczne są nieskuteczne u znaczącej części chorych lub wiążą się z poważnymi działaniami niepożądanymi. Wyniki uzyskane przez Doktoranta nie tylko pogłębiają wiedzę na temat mechanizmów leżących u podstaw AZS, lecz mają również istotny potencjał translacyjny, co znajduje potwierdzenie w udzielonym patencie na zastosowanie inhibitorów białka HSP90 w leczeniu AZS u ludzi, którego Doktorant jest współautorem.

W związku z powyższym stwierdzam, że recenzowana **rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Sitko spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Sitko do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie **zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne z wnioskiem o przyznanie rozprawie wyróżnienia** ze względu na jej wysoki poziom naukowy, wynikający z kompleksowości i wielowymiarowości przeprowadzonych badań oraz zastosowania szerokiego wachlarza technik badawczych i modeli eksperymentalnych. Publikacje wchodzące w skład rozprawy wnoszą istotny i nowatorski wkład w zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw patogenezy AZS. Nie tylko wyznaczają one nowe kierunki badań w tej dziedzinie, ale

również tworzą solidne podstawy do dalszych badań klinicznych nad nową strategią terapeutyczną w AZS.

dr hab. Aleksander Grabiec, prof. UJ