

wp - 14.05 - 2019 I.M



Kraków, 8 maja 2019r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Elwiry Smolińskiej pt. "Molekularny mechanizm działania genisteiny w aspekcie jej potencjalnego zastosowania w leczeniu łuszczycy"

przygotowanej w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani Profesor Magdaleny Gabig-Cimińskiej.

Skóra jest największym narządem organizmu ludzkiego stanowiącym barierę ochronną, a o skuteczności jej funkcjonowania decyduje naskórek. To wielowarstwowa tkanka nabłonkowa podlegająca ciągłej przebudowie, warunkowanej intensywną proliferacją i różnicowaniem komórek. Ścisła kontrola tych procesów jest niezbędna dla zachowania jej homeostazy, a jej zaburzenie implikuje wiele schorzeń, w tym zmian także o charakterze przewlekłym, powodującym duży dyskomfort życia i często mu zagrażającym. Jednym z przykładów przewlekłych chorób skóry wywołanych zaburzeniem w funkcjonowaniu układu odpornościowego jest łuszczyca. Zmiany skórne, jakimi manifestuje się ta choroba są skutkiem aktywności limfocytów T naciekających tkankę i wydzielających cytokiny tj.: TNF- α , Il-6, -8, -17, -19, -23, które indukują nasiloną proliferację keratynocytów, nieprawidłowe różnicowanie i stratyfikację naskórka. Proponowane schematy leczenia tej choroby poprzez działania immunomodulacyjne i antyproliferacyjne, prowadzą jedynie do łagodzenia jej objawów, zatem poszukiwanie nowych terapii jest jak najbardziej zasadne. Dla opracowania nowych strategii terapeutycznych łuszczycy stosuje się różne modele *in vitro* i *in vivo*, które w mniej lub bardziej precyzyjny sposób naśladują proces zapalny w naskórku, dlatego wciąż prowadzone są badania nad opracowaniem prostego, powtarzalnego, dobrze zwalidowanego modelu.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja Pani mgr Elwiry Smolińskiej świetnie wpisuje się w ten nurt badań i jest bardzo dobrym przykładem kompleksowego podejścia do zagadnienia badania wpływu genisteiny na procesy komórkowe w modelu łuszczycy. Flawonoid ten ma działanie plejotropowe, a jeśli chodzi o skórę to jest uważany za regulator odpowiedzi zapalnych. Jest silnym inhibitorem wytwarzania czynników prozapalnych przez makrofagi i komórki śródbłonna, działa także antyproliferacyjnie, stąd zbadanie mechanizmu działania tego leku w komórkowym modelu łuszczycy, dla potencjalnego zastosowania w terapii, którego podjęła w swej rozprawie Doktorantka jest w pełni uzasadniony.

Wydział

Biochemii, Biofizyki

i Biotechnologii

Zakład Biologii Komórki

BANK KOMÓREK

Kierownik

dr hab. Justyna Drukała
Prof. UJ

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 61 45

fax +48(12) 664 69 02

email:

justyna.drukala@uj.edu.pl

Podczas realizacji swojej pracy doktorskiej Pani mgr Smolińska dokonała rzetelnego przeglądu literatury dotyczącej modeli wykorzystywanych w badaniach łuszczycy. W oparciu o zdobytą wiedzę i doświadczenia zaproponowała nowy oryginalny model *in vitro*. Z kolei wykorzystując ten model podjęła badania w celu określenia mechanizmu działania genisteiny. Dopełnieniem tych eksperymentów była analiza wyników badania klinicznego, którym objęci byli chorzy na łuszczycę plackowatą leczeni genisteiną.

Praca stanowi zbiór trzech opublikowanych prac, których Pani mgr Smolińska jest wiodącym autorem. Stanowią one spójną całość, co jest zgodne z art. 13 pkt 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami, to jest z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)*”. Wszystkie prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny współczynnik oddziaływania IF = 7,86).

Ponieważ wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie, na końcu rozprawy zamieszczono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac. Według oświadczeń współautorów Pani mgr Ewelina Smolińska jest głównym autorem, wykonała większą część doświadczeń w prezentowanych artykułach, brała czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowywania wyników oraz pisania manuskryptów.

Gdy rozprawę doktorską stanowią opublikowane prace recenzent ma znacznie ułatwione zadanie, albowiem publikacje już zostały poddane wnikliwej ocenie przez wskazanych przez redakcję, w której interesie jest utrzymanie wysokiego rankingu czasopisma, niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Biorąc pod uwagę pozytywną ocenę publikacji przez niezależnych redaktorów, recenzentów i dołączając do tego własną ocenę nie mam merytorycznych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

Publikacje poprzedzone są obszernym omówieniem wyników w nich zaprezentowanych (w języku angielskim i polskim).

Pierwsza praca ma charakter przeglądowy i stanowi świetne, bardzo informatywne kompendium wiedzy na temat dostępnych modeli wykorzystywanych w badaniach nad łuszczycą. Autorka dokonała gruntownego przeglądu literatury, co pozwala sądzić że szczegółowo zaznajomiła się z aktualną wiedzą dotyczącą badań nad łuszczycą.

Praca zatytułowana „*Models in the research process of psoriasis*” została opublikowana w 2017 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, którego współczynnik oddziaływania wynosi 3,7. Autorka brała udział w pisaniu manuskryptu i przygotowaniu oprawy graficznej. W publikacji zostały omówione obecnie wykorzystywane w badaniach łuszczycy modele *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Przedstawiono wady i zalety poszczególnych modeli. Złożone modele *in vitro* konstruowane w oparciu o kokultury komórek naskórka i komórek układu odpornościowego coraz wierniej oddają rzeczywiste zależności i oddziaływania komórkowe w zmienionej chorobowo tkance, są jednak trudne do zwalidowania. Proste modele tworzone są w oparciu o jeden typ komórek – keratynocyty ludzkie, stymulowane cytokinami prozapalnymi dla naśladowania stanu zapalnego charakterystycznego dla przebiegu łuszczycy tj.: IL-1 α , IL-6, IL-17A, IL-22, TNF- α , NF κ B,

IFN- γ , OSM. Ze względu na trudności w hodowli keratynocytów izolowanych z naskórka łuszczykowego i dużą zmienność w hodowlach prawidłowych keratynocytów wykorzystuje się unieśmiertelnioną linię komórek naskórka ludzkiego HaCaT. Pomimo pewnych mutacji w genomie, komórki HaCaT zachowują zdolność do proliferacji i różnicowania oraz mają zdolność do tworzenia wielowarstwowych naskórków, chociaż w kontekście ekspresji cytokeratyn, profil różnicowania jest nieco odmienny. Istnieją jednak doniesienia Sobolewa i współpracowników z 2014 r., które Doktorantka cytuje w swojej publikacji, iż w odróżnieniu od prawidłowych keratynocytów, komórki tej linii nie odpowiadają na stymulację niektórymi cytokinami prozapalnymi dominującymi w przebiegu łuszczy, tj. TNF- α , IFN- γ , IL-17.

Doktorantka w swojej dysertacji wykorzystwała komórki HaCaT do stworzenia nowego modelu łuszczy *in vitro*, dla weryfikacji którego badała zmiany w ekspresji wybranych markerów różnicowania. Do stymulacji komórek HaCaT w swoim modelu łuszczy Pani Smolińska wykorzystwała IL-1A, IL-17A, IL-22, OSM i TNF- α . Czy mogę prosić o wyjaśnienie dlaczego taka właśnie kombinacja cytokin została wybrana do stymulacji?

Doktorantka w streszczeniu swojej dysertacji, na str. 17 pisze „Walidacja otrzymanego 2D łuszczykowego modelu (...) opierała się na (...) analizie genów będących: i) markerami różnicowania keratynocytów, tj. KRT10, którego poziom ekspresji jest podwyższony ze względu na silną hyperproliferyację, towarzyszącą stanom zapalnym skóry. – Czy mogę prosić o komentarz do tego zdania?”

W drugiej, obszernej pracy zatytułowanej „*Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT*” opublikowanej w ubiegłym roku w czasopiśmie PLoS ONE (IF 2,8) Autorka przedstawia wyniki badań mechanizmu działania genisteiny na keratynocyty ludzkie w modelu łuszczy, który w tej właśnie publikacji został opisany i zwalidowany. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy, wykonała zdecydowaną większość eksperymentów i analiz. W tym miejscu pragnę podkreślić szeroki panel metod biologii molekularnej, jaki opanowała p. mgr Smolińska i wykorzystwała w swoich badaniach, od prowadzenia hodowli komórek, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym, analizy danych mikromacierzowych, cytometrii przepływowej, po mikroskopię fluorescencyjną, testy ELISA. Użycie tak urozmaiconych, lecz wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Doktorantki. Ich opis jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń, oczywiście przez osobę dysponującą odpowiednim sprzętem i wiedzą.

W swoich badaniach mgr Elwira Smolińska analizowała wpływ genisteiny na ekspresję genów w komórkach HaCaT. Za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych zbadała zmiany w ekspresji 25000 genów w komórkach po zadziałaniu genisteiny.

Wykonała analizy ontologiczne identyfikujące szlaki oraz procesy komórkowe modulowane na poziomie transkryptomu przez genisteinę. Wśród struktur komórkowych charakteryzujących się największą liczbą genów o zmienionej ekspresji wskazała na przedziały wewnątrzkomórkowe oraz jądrowe. Wykazała także, że dwa szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w utrzymanie homeostazy w naskórku i rozwój łuszczy – związany z receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów oraz z receptorami

wewnątrzkomórkowymi NOD-podobnymi, podlegają najsilniejszej modulacji pod wpływem genisteiny. Szacunkowy charakter badań z wykorzystaniem mikromacierzy wymusił konieczność weryfikacji ilościowej dla potwierdzenia uzyskanych wyników, którą Doktorantka przeprowadziła metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Choć, jak wcześniej wspomniano, za przebieg łuszczycy odpowiadają cytokiny prozapalne wydzielane przez limfocyty T, to również pobudzone keratynocyty wykazują ekspresję genów kodujących białka uczestniczące w procesie zapalnym oraz wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu. Na podstawie listy genów przygotowanej w oparciu o dane z bazy KEGG oraz AmiGO Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę poziomu ekspresji 90 genów w keratynocytach, których produkty zaangażowane są w mechanizm łuszczycy, oraz szlaków, których dysfunkcja jest odpowiedzialna za proces zapalny w naskórku. Szczegółowa analiza uzyskanych wyników wykazała, iż genisteina wpływa na ekspresję licznych genów związanych z łuszczycą. Zidentyfikowano geny kodujące białka, które uczestniczą w przekazywaniu sygnału za pośrednictwem ścieżek sygnalizacyjnych kinaz MAP, rodziny czynników transkrypcyjnych FOXO, metabolizmu kwasów tłuszczowych, cyklu komórkowego i szlaków metabolicznych.

W kolejnym etapie badań Doktorantka sprawdziła, jakie mechanizmy działania genisteiny odpowiedzialne są za zmianę fenotypu komórek HaCaT w modelu łuszczycy. Cytokiny biorące udział w reakcji zapalnej w skórze pozostają pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego NFκB, stąd ekspresję tego czynnika poddała analizie. Po zastosowaniu genisteiny stwierdziła obniżony poziom fosforylacji NFκB i jego translokacji do jądra komórkowego. Za aktywowanie NFκB odpowiada ścieżka sygnałowa z udziałem PI3K/AKT. Przeprowadzone przez doktorantkę badania nie ujawniły zmian w aktywacji tej ścieżki po podaniu genisteiny, dlatego – jako że czynnik transkrypcyjny NF-κB jest wrażliwy na zmiany stanu redox w komórce - zwróciła uwagę na ścieżkę sygnałową ROS/NFκB i wykazała, że genisteina powoduje redukcję akumulacji reaktywnych form tlenu w keratynocytach, które jednocześnie wydzielają istotnie mniej cytokin prozapalnych, tj. Il-8, Il-20, CCL2.

Wyniki badań *in vitro* wskazujące jednoznacznie na przeciwzapalne działanie genisteiny w modelu łuszczycy skłoniły Doktorantkę do przeprowadzenia analizy wyników badania klinicznego, którym objęci byli chorzy na łuszczycę plackowatą leczeni genisteiną.

Celem tego badania było sprawdzenie bezpieczeństwa stosowania genisteiny, jej tolerancji, działania farmakodynamicznego i skuteczności w leczeniu łuszczycy. Mimo, że badania przeprowadzone przez klinicystów na 90-osobowej grupie pacjentów nie wykazały skuteczności działania genisteiny, to u czterech pacjentów odnotowano pewną regresję fenotypu łuszczycowego.

Analiza poziomu transkryptów w bioptatach skóry i krwi obwodowej pobranej od tych czterech pacjentów wykazała zmiany w poziomie transkrypcji genów kodujących mediatory przeciwzapalne i przeciwluszczycowe po zastosowaniu genisteiny. Na liście genów znalazło się 10 transkryptów, które ulegały modulacji również w eksperymentach prowadzonych wcześniej na modelu *in vitro*. Rozważania dotyczące oceny modulacji ekspresji genów zaangażowanych w stan zapalny w łuszczycy w materiale pochodzącym od czterech

pacjentów skłoniły Autorkę do wysnucia wniosku o możliwości wykorzystania genisteiny jako środka przeciwzapalnego w leczeniu łuszczycy.

Wyniki tych analiz Doktorantka opisała w trzeciej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pracy, opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica* (IF 1,46).

Po lekturze tej pracy nasuwa się ogólna refleksja potwierdzająca potrzebę opracowywania terapii zindywidualizowanej, opartej na wnikliwej diagnostyce molekularnej.

Podsumowanie

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

Pani mgr Elwira Smolińska opracowała nowy model badawczy dla analizy mechanizmów leżących u podstaw łuszczycy i wykorzystała go do zbadania efektu działania genisteiny na funkcje i fenotyp keratynocytów. Bardzo ważnym wynikiem badań Doktorantki jest wskazanie na inhibicyjny charakter genisteiny w ścieżce sygnałowej ROS/NFκB.

Wyniki zaprezentowanych badań przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw patogenezy łuszczycy, a także wskazują na możliwości wykorzystania genisteiny w terapii tej jednostki chorobowej. Mam nadzieję, że badania będą kontynuowane, być może – do czego zachęcam - z wykorzystaniem modelu prawidłowych ludzkich keratynocytów i przyczynią się do wypracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób skóry o podłożu zapalnym.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pracy Pani mgr Elwiry Smolińskiej w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz o tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr65, poz595, wraz z późniejszymi zmianami). określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.z 2017 r. poz. 1789). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego Pani mgr Elwiry Smolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej wnoszę o jej wyróżnienie.

