KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1
tel. 0 58 349 14 37
fax 0 58 349 14 19
e-mail: histolog@gumed.edu.pl

Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 230
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska

Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 06.11.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Justyna Joanna Trynda

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Justyny Tryndy** są: „**Czynniki molekularne determinujące wrażliwość komórek ludzkich białaczek i chłoniaków na kalcytriol i takalcytol**".

Promotor pracy: **dr hab. Joanna Wietrzyk, prof. nadzw.** Zakład Onkologii Doświadczalnej Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Witamina D_3 powstaje w sposób naturalny w komórkach skóry (keratynocytach) pod wpływem działania promieniowania ultrafioletowego typu B, zawartego w świetle słonecznym. Zgodnie z klasycznym modelem, do pełnej aktywacji witamin D (kalciferol) wymaga sekwencyjnej modyfikacji poprzez hydroksylację w wątrobie i nerkach. Co ciekawe, skórka jest jedynym organem, w którym zachodzą wszystkie etapy powstawania aktywnej formy witaminy D – kalcytriolu ($1,25(OH)_2D_3$). Kalcytriol pełni istotną rolę w zachowaniu homeostazy wapniowo-fosforanowej oraz jest niezbędny dla prawidłowego działania układów: kostnego, nerwowego, mięśniowego, immunologicznego oraz skóry. Witamina D reguluje również wzrost i różnicowanie się komórek, co jest szczególnie istotne dla procesu odnowy bariery naskórkowej, czy dojrzewania komórek układu immunologicznego.

Z uwagi na plejotropowe działanie witaminy D od wielu lat prowadzone są badania nad zastosowani witaminy D w terapii. Co więcej, ogólnoświatowy niedobór witaminy D, wiązany jest nie tylko z występowaniem osteoporozy, czy krzywic, lecz również ze zwiększoną zapadalnością na szereg chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów. Zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych przez kalcytriol zostało potwierdzone w badaniach *in vitro, in vivo,* oraz w badaniach klinicznych na wielu modelach, jednak jego potencjalne zastosowanie jest ograniczone przez ryzyko hyperkalcemii. Dlatego też,

poszukuje się analogów witaminy D, o niewielki wpływie na homeostazę wapniowo-fosforanową, przy zachowanej wysokiej aktywności przeciwnowotworowej oraz immunomodulacyjnej. Oddzielnym zagadnieniem są badania dotyczących markerów wrażliwości na witaminę D, które mogłyby być wykorzystane do preselekcji pacjentów do terapii celowanej.

Rozprawa doktorska Justyny Tryndy świetnie wpisuje się w nurt najnowszych badań, wiążąc badania cytotoksyczności analogów witaminy D z badaniem mechanizmów wewnątrzkomórkowych aktywowanych przez te związki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w formie monografia, przygotowana została zgodnie, z tak zwanym „starym trybem" (Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 września 2011 r., będącym nowelizacją art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Manuskrypt zawiera, aż 180 stron maszynopisu, w tym, 13 rycin, 20 tabel oraz aż 67 wykresów, które bardzo dobrze ilustrują i podsumowują omawiane zagadnienia. Warto zwrócić uwagę, że część badań ujętych w rozprawie, zostało już opublikowanych w *International Journal of Molecular Sciences* (*INT J MOL SCI 2015; 16(10): 24873–24894*), a mgr Justyna Trynda jest pierwszym autorem tego manuskryptu.

b) ocena uzyskanych rezultatów

Główna część rozprawy doktorskiej Justyny Tryndy opiera się na wynikach badania wrażliwości 9 linii komórkowych ludzkich białaczek i chłoniaków na aktywną formę witaminy D - kalcytriol ($1,25(OH)_2D_3$) oraz nową pochodną takalcytol ($1,24(OH)_2D_3$)

Oprócz badań dotyczących zahamowania wzrostu, czy cyklu komórkowego, autorka skupiła się na znalezieniu potencjalnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wrażliwość komórek na pochodne witaminy D w zależności od czasu inkubacji. We wstępnych badaniach mgr Trynda określiła wpływ badanych związków na tempo podziałów komórkowych (metodą MTT), cykl komórkowy (cytometria przepływowa), morfologie komórek (barwienia May-Grunwald-Giemsa), oraz indukcję różnicowania się komórek poprzez wykrywania markerów powierzchniowych (cytometria przepływowa). Następnie doktorantka podjęła się próby znalezienia korelacji między wrażliwość badanych linii na kalcytriol lub takalcytol, a stopniem zróżnicowania oraz pochodzeniem komórek (linie mieloidalne vs limfoidalne), indukcją ekspresji genów związanych z aktywnością witaminy D (VDR PDIA3), oraz polimorfizmu receptora wiążącego witaminę D - VDR. Na szczególną uwagę zasługują badania dotyczące wpływu analogów witaminy D na ekspresję białek CYP24A1, p53, NFκB, Bak1, Bim, p21, p27 oraz specyficznych dla tych białek regulatorowych cząsteczek miRNA.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań należy wymienić:

- wyższą wrażliwość linii mieloidalnych w porównaniu do limfoidalnych, ze szczególnym uwzględnieniem badań dotyczących zahamowania proliferacji, zatrzymania cyklu komórkowego oraz indukcji różnicowania się komórek.

- wzrost poziom VDR, PDIA3 oraz CYP24A1 (mRNA i białko) pod wpływem analogów witaminy D, szczególnie w linia wrażliwych.
- wykazanie związku polimorfizmów VDR na wrażliwość komórek na analogi witaminy D.
- podwyższenie poziom inhibitora cyklu komórkowego białka p27, ale nie p21 pod wpływem badanych związków.
- obniżenie poziomu białka p53 oraz czynnika transkrypcyjnego NFκB pod wpływem kalcytriolu i takalcytol.
- obniżenie poziomu białka proapoptotycznego Bim oraz podwyższenie Bak1 po zastosowaniu badanych analogów witaminy D.
- zbadanie korelacji między poziomem specyficznych miRNA, a poziomem badanych białek.

Należy podkreślić bardzo dużą różnorodność technik oraz doświadczeń wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, co świadczy nie tylko o świetnym opanowaniu warsztatu badawczego, ale również o tym, że mgr Justyna Trynda, świetnie porusza się w tematyce nowotworów krwi, jak i witaminy D.

Jako przewodni cel pracy autorka podaje poszukiwanie czynników molekularnych odpowiedzialnych za wrażliwość komórek nowotworowych na analogi witaminy D. Pomimo ogromnej ilość przeprowadzonych badań oraz bardzo skrupulatnej prezentacji i omówieniu wyników, odnoszę wrażenie, że tak naprawdę przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to raczej początek badań, które mam nadzieję, będą kontynuowane. Doktorantka świetnie zdaje sobie sprawę z pewnych ograniczeń w interpretacji wyników, gdyż szereg wniosków formułuje w trybie przepuszczającym np. „*Poziom cząsteczek miR-27b i 125b może wpływać na wrażliwość komórek… poprzez obniżenie ilości VDR*" (wiosek 6, strona 137). Taki ostrożne podejście od interpretacji wyników świadczy o dużej dojrzałości naukowej doktorantki. Z drugiej strony pozostaje pewien niedosyt i pytanie, czy nie można było skupić się np. tylko na indukcji apoptozy i zbadać dogłębnie mechanizmy aktywowane przez kalcytriol czy takalcytol, wykazując potencjalne różnice między liniami i związkami?

Z uwagi na funkcję recenzenta, ma kilka pytań, uwag, sugestii, które należy traktować, raczej jako przejaw mojej ciekawości naukowej, niż krytykę pracy.

1. Autorka wskazuje na bardzo krótki okres połowicznego rozpadu kalcytriolu, który wynosi od 4 do 6 godziny. Czy w doświadczeniach, które trwały do 120 godzin, podawano badane związki kilkukrotnie, czy wymieniano pożywkę? Czy wiadomo coś na temat stabilności takacytolu?
2. W przedstawionych badaniach dość sporo miejsca poświęcono białkom regulującym apoptozę (p53, Bak1, Bim) oraz miRNA, które wpływają na ich ekspresję. Nie znalazłem natomiast badań samej apoptozy. Co ciekawe, już przy badaniu cyklu komórkowego, można było uzyskać pewne informacje na temat apoptozy, badając frakcja subG1. Czy autorka badała indukcję apoptozy?
3. Jak doktorantka interpretuje znaczne rozbieżności między względnym poziomem mRNA, a ilością białka w badanych liniach (np. CYP24A1 Wykres 4.19), oraz w wielu miejscach brak korelacji między zmianami poziom mRNA i białka po stymulacji analogami witaminy D (np. Wykres 4.21).

4. Rozdział dyskusja jest bardzo ciekawy, a autorka bardzo sprawnie porusza się w tematyce. Zastanawiam się, tylko czy doktorantka stosowała jakieś narzędzia statystyczne, dzięki którym powstały Tabele 6.2-6.8? Jeśli nie to, na jakie podstawie określała znamienność zmiany badanych parametrów?
5. Troszeczkę brakuje dyskusji dotyczącej porównania własności kalcytriol i takalcytol. Np. czy autorka obserwowała jakieś różnice we wrażliwości komórek lub poziomie badanych białek po indukcji.

Chciałbym również dodać, że o ile autorka stosuje klasyczny podział nowotworów krwi (klasyfikacja FAB) to bardzo dobrze omawia uzyskane wyniki w oparciu analizę kariotypów badanych linii, aby wykazać potencjalny wpływ mutacji, translokacji oraz powstawania białek fuzyjnych na wyniki swoich badań, co w mojej opinii jest bardzo słusznym podejściem.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Praca napisana jest bardzo dobrze, a czytający nie ma problemu, ze zrozumieniem jej treści, ani z podążaniem za logiką przedstawianych wyników. Autorka bardzo skromnie opisuje wyniki, stosując stronę bierną (zrobiono, wykonano), co jest charakterystyczne dla publikacji naukowych. Natomiast w przypadku pracy doktorskiej należałoby jednak pisać w pierwszej osobie liczby pojedynczej, co jednoznacznie określiłoby wkład doktorantki w wykonanie prezentowanych doświadczeń. Od strony językowej chciałbym jedynie zwrócić uwagę na pewne stwierdzenia, które od lat pojawiają się w pracach naukowych, a są pewnymi skrótami myślowymi lub przyjęły się mimo tego, że nie do końca są poprawne.

1. Ekspresja białek – geny ulegają ekspresji, białka powstają w wyniku syntezy, a proces ten nazywany jest translacją.
2. Ilość cząsteczki zamiast ilość białka.
3. Western blott, raczej Western blot
4. W spisie pojawia się również CYP24 i CYP27, chociaż w pracy białka te są poprawnie identyfikowane CYP24A1 oraz CYP27A1 lub CYP27B1.
5. Na stronie 22: 25-hydroksylazą jest CYP24A1, a powinien być CYP2R1 (ewentualnie zgodnie ze starszą literaturą CYP27A1).

Oddzielnym problemem są tłumaczenia z polskiego na angielski i odwrotnie. W streszczeniu w języku angielskim znajdują się, między innym, takie stwierdzenia: „The aim of the study was understanding", "linear origin", "associated with aggressive disease".

Część skrótów (w spisie skrótów) przetłumaczono niepoprawnie lub dosłownie:
„ASR (ang. awareness of anger) - współczynnik surowy zachorowalności lub umieralności"
„DLBCL (ang. diffuse large B-cell lymphoma) - chłoniak z dużych rozlanych limfocytów B". Na szczęście, w tekście rozprawy skrót ten jest poprawnie wyjaśniony.

Chciałbym podkreślić, że niewielki błędy, które wymieniłem, nie wpływają na ogólną ocenę pracy i są zrozumiałe w przypadku tak obszernego opracowania (180 stron).

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

mgr Justyna Trynda bardzo dobrze porusza się zarówno w terminologii biologicznej, klinicznej, jak i biochemicznej. Wstęp do rozprawy zawiera liczne dobrze dobrane odnośniki literaturowe (imponująca liczba 366 pozycji). Mała uwaga dotycząca klasyfikacji nowotworów układu krwionośnego oraz limfatycznego. Warto zwrócić uwagę, że opublikowano szereg nowszych opracowań niż cytowana klasyfikacja WHO z 2008. Jest to istotne, gdyż rozwój technik sekwencjonowania DNA w ostatnich latach zdecydowanie powiększył naszą wiedzę dotyczącą tych nowotworów. Niemniej jednak w części dyskusja autorka odnosi się w głównej mierze właśnie do najnowszej literatury.

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

Podjęta tematyka włącza się bardzo dobrze w nurt światowych badań nad zastosowaniem analogów witaminy D w terapii przeciwnowotworowej. Problem badawczy został sformułowany poprawnie, a głównym celem było znalezienie podstaw molekularnych wrażliwości komórek nowotworowych na D kalcytriol i takalcytol. Później autorka wymienia szereg podpunktów, które mają prowadzić do osiągnie określonego celu. Doktorantka również poprawnie interpretuje wyniki, a w podsumowaniu przedstawia osiągnięte cele badawcze. Jak już wspominałem, z uwagi na bardzo dużą różnorodność badanych procesów ich pełne zbadanie wymagałoby dokładniejszej analizy molekularnej.

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

Autorka wykorzystała klasyczne metody biologii molekularnej takie jak test MTT, badanie cyklu komórkowego oraz analizy powierzchniowych antygenów przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej. Analizę względnego poziomu mRNA oraz polimorfizmu wykonała przy pomocy techniki PCR. Poziom białka w komórkach oznaczała stosując technikę Western blot oraz testu ELISA. **Chciałbym, w tym miejscu podkreślić ogromną ilość wykonanych oznaczeń, ich dobre zaplanowanie, oraz skrupulatną analizę.** Wydaje mi się, że właśnie ze względu na ilość doświadczeń i bogatą metodologię, uważne przeczytanie manuskryptu rodzi kilka pytań.

Pierwsze pytanie dotyczy wyboru metody. W badaniach białek VDR i PDIA3, autorka stosowała metodę Western blot, która być może nie jest idealna do oznaczeń ilościowych, natomiast umożliwia jakościową ocenę badanych białek. Dlaczego w dalszej części pracy wykorzystano test ELISA? Czy równolegle (przynajmniej wybiórczo) potwierdzono uzyskane wyniki metodą Western blot? Co oznacza zapis poziom białka w pg, bądź ng na ml? Może na mililitr lizatu komórkowego?

W punkcie 4.1 (strona 53) podano definicję IC_{50}. O ile angielska definicja jest raczej poprawna (the half maximal inhibitory concentration), to niestety wydaje się, że polskie tłumaczenie może być mylące: „wartość stężenia, przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji 50% komórek" (strona 53). Co tak naprawdę w pracy określane jest, jako IC_{50}, czy stężenie analogu, przy którym osiąga się 50% maksymalnego zahamowania wzrostu komórek, czy też takie stężenie analogu, przy który uzyskiwano zahamowanie 50% wszystkich komórek?

Ciekaw również jestem, w jaki sposób przeprowadzono badani frakcji komórek aneuploidalnych?

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Justyny Tryndy.** Świadczy o tym, wielokierunkowa analiza wpływ badanych związków na sporą grupę, bo aż 9 linii nowotworowych. Na szczególne uznanie zasługuje włączenie badań miRNA, jako czynnika regulującego ekspresję badanych genów.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ, zawiera dokładny spis treści, drobiazgowy spis skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, bardzo obszerny wstęp, wypunktowane cele pracy, obszerny rozdział dotyczący materiałów i metod, później rozdział rezultaty oraz dyskusję. Należy podkreślić imponującą ilość zgromadzonej literatury (366 pozycji). Manuskrypt zawiera również, spis rycin, tabel i schematów, oraz suplement, w którym zamieszczone są dodatkowe wyniki, które dopełniają pracę.

Praca jest przejrzysta, a rysunki, tabele oraz wykresy świetnie ją ilustrują. Szkoda tylko, że nie udało się doktorantce zachować jednej formatu wykresów pod względem kolorystyki, chyba, że ma to jakieś znaczenie dla pracy, którego ja nie byłem w stanie niestety docenić.

3) wnioski końcowe (konkluzja).

Podsumowując, monografia Justyny Tryndy oparta jest o imponującą serię doświadczeń, wyniki są dobrze opisane i zilustrowane, a dyskusja bardzo ciekawa i wyważona. Szkoda tylko, że zasadnicza część pracy nie została jeszcze opublikowana. Natomiast z drugiej strony, mam nadzieję, że moje drobne uwagi zadziałają stymulująco i przyczynią się powstania bardzo dobrych publikacji. Uważam, więc że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani Justyny Tryndy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Gdańsk, dnia 06.11.2017

Prof. dr hab. Michał Żmijewski,