



Dr hab. n. med. Michał Pikula
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Zakład Embriologii, Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, bud. CBM
tel. 58 3491368, 58 3491495
E-mail: pikula@gumed.edu.pl

Gdańsk, 24.05.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Elwiry Smolińskiej pt. „Molekularny mechanizm działania genisteiny w aspekcie jej potencjalnego zastosowania w leczeniu łuszczycy”, napisanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej. Recenzja opracowana na zlecenie Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Praca doktorska Pani mgr Elwiry Smolińskiej pt. „Molekularny mechanizm działania genisteiny w aspekcie jej potencjalnego zastosowania w leczeniu łuszczycy”, została wykonana w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej. Podstawą pracy stanowią trzy publikacje: jedna przeglądowa oraz dwie oryginalne. Autorka przedstawiła na wstępie pracy doktorskiej streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie umieściła trzy publikacje oraz oświadczenia współautorów. W streszczeniu zostały omówione podstawy etiopatogenezy łuszczycy, główne wyniki badań zawartych w publikacjach wchodzących w skład pracy doktorskiej oraz wnioski. Autorka jako główny cel pracy przedstawiła określenie mechanizmu działania genisteiny w kontekście modulacji procesów komórkowych dla potencjalnego jej zastosowania w terapii łuszczycy. Temat podjęty przez Doktorantkę jest niezmiernie istotny z uwagi na fakt, iż łuszczyca wciąż pozostaje ogromnym problemem i wyzwaniem dla współczesnej medycyny, biotechnologii a także przemysłu farmaceutycznego. Wynika to w dużej mierze ze złożonego mechanizmu rozwoju i przebiegu klinicznego tego schorzenia. Łuszczyca towarzyszą zmiany skórne związane m. in. z hiperproliferacją i zaburzeniami różnicowania keratynocytów, naciekiem zapalnym oraz tworzeniem nieprawidłowych naczyń krwionośnych w skórze. W proces chorobotwórczy zaangażowanych jest wiele rodzajów komórek, w tym keratynocyty, fibroblasty oraz komórki układu immunologicznego (limfocyty, monocyty). Genisteina jako flawonoid o częściowo przebadanych już właściwościach, może potencjalnie stanowić alternatywę lub uzupełnienie klasycznego leczenia łuszczycy. Genisteina posiada bowiem udowodnione przez innych Autorów właściwości przeciwzapalne, antyproliferacyjne, a także hamuje angiogenezę oraz wpływa na metabolizm komórkowy.

Pierwsza publikacja (poglądowa) „Models in the Research Process of Psoriasis”, opublikowana w 2017 roku w *International Journal of Molecular Sciences* zawiera przegląd metod i modeli, które mogą być wykorzystane do badania procesów zachodzących podczas przebiegu łuszczycy, a także do oceny działania związków, potencjalnych leków przeciwluszczycowych. Praca zawiera również podstawowe informacje na temat etiopatogenezy łuszczycy, a szczególnie roli układu immunologicznego w rozwoju i przebiegu klinicznym tego schorzenia. W pracy szczegółowo omówiono różnice między modelami *in vivo* oraz *in vitro*. Zwrócono uwagę na ograniczenia modeli zwierzęcych i trudności w przenoszeniu wyników doświadczeń z udziałem zwierząt na praktykę kliniczną. W publikacji przedstawiono modele *in vitro*, w tym model rekonstrukcji skóry 2D z wykorzystaniem keratynocytów pobranych od pacjentów, jak również transformowanej linii komórkowej HaCaT. Omówiono również genetycznie modyfikowane modele mysie, w których odpowiednie geny ulegają nadekspresji lub wyciszeniu przez zaindukowanie w nich mutacji. Opisano także możliwości ksenotransplantacji skóry. Publikacja ta może mieć duże znaczenie dla zespołów badawczych, które zgłębiają patomechanizm łuszczycy, a szczególnie oceniają działanie nowych związków, potencjalnych leków przeciwko łuszczycy. Należy w tym miejscu dodać, iż wybór modelu badawczego ma kluczowe znaczenie dla właściwej oceny działania nowo opracowywanych potencjalnych leków. Tym bardziej należy docenić dokładne omówienie przez Autorów różnych możliwości badania związków przeciwluszczycowych.

W drugiej pracy (oryginalnej) „Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT” opublikowanej w 2018 roku w *PLoS One*, Doktorantka (pierwszy Autor) wraz z zespołem, przedstawiła proponowany mechanizm działania genisteiny na ludzkie komórki HaCaT w modelu indukowanej *in vitro* łuszczycy. W pracy zastosowano szereg metod badawczych takich jak: testy żywotności komórek, bezpośrednie i pośrednie stymulacje komórek *in vitro* (linia keratynocytów HaCaT oraz linia monocytarno-makrofagowa THP-1), analizę ilościową metodą RT-PCR, badania fosforylacji kinazy PI3K oraz aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, pomiary reaktywnych form tlenu (ROS) oraz testy ELISA. Doktorantka wykazała w pracy, iż genisteina wpływa na zmianę ekspresji szeregu genów w linii komórkowej HaCaT (łącznie oceniono poziomy ok. 2500 transkryptów). Część z tych genów bierze także udział w naturalnym przebiegu łuszczycy i, co ważne, może być potencjalnie celem dla terapii łuszczycy. Niektóre z tych genów pokrywają się z genami



przebadanymi przez zespół wcześniej, wykorzystując jako model badawczy ludzkie fibroblasty (*CEBPD*, *EIF5*, *HMOX1*, *HSPE1*, *IL8*, *KPNA2*). Przedstawione analizy ontologiczne wykazały, iż pod wpływem genisteiny zmianie uległy m. in. szlaki związane z receptorami PPAR oraz receptorami NOD. Szlaki te są zaangażowane w utrzymanie prawidłowej równowagi w naskórku, a ich deregulacja zachodzi w skórze pacjentów z łuszczycą. W pracy wykazano również, iż genisteina hamuje proliferację keratynocytów. Ważnym elementem tej pracy było zastosowanie modelu, który w znacznym stopniu imituje zachowanie komórek pochodzących od pacjentów z łuszczycą. W modelu tym wykorzystano keratynocyty linii komórkowej HaCaT oraz komórki linii THP-1 stymulowane przez grupę czynników (*IL-1A*, *IL-17A*, *IL-22*, *OSM*, *TNF- α* , *LPS*). Walidacja modelu opierała się na analizie ekspresji wybranych genów, których profil ekspresji zmienia się w komórkach pacjentów z łuszczycą (*KRT10*, *LOR*, *S100A7*, *A100A9*). W pracy wykazano, iż stosowane warunki hodowli (stymulacja cytokinami i genisteina) powodują zmianę w ekspresji 63 genów, które zostały pogrupowane na 5 tzw. klastrów. Autorzy wykazali również zahamowanie fosforylacji oraz translokacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B pod wpływem genisteiny. Ponadto zaobserwowali redukcję tworzenia reaktywnych form tlenu oraz niektórych cytokin (*IL-8*, *IL-20*, *CCL2*) pod wpływem genisteiny.

W trzeciej publikacji (oryginalnej) „Genistein modulates gene activity in psoriatic patients” ukazanej w 2019 roku w *Acta Biochimica Polonica*, Autorka przedstawiła wyniki molekularne pochodzące z badań klinicznych. Na badania te uzyskano zgodę komisji bioetycznej oraz zarejestrowano je w Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych (CEBK). Badania przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską. Doktorantka w streszczeniu pracy doktorskiej podała, iż badanie kliniczne obejmowało 34 pacjentów u których jednak nie zaobserwowano znaczącej poprawy klinicznej za wyjątkiem wyników ogólnej oceny lekarskiej (PGA, *Physician Global Assessment*). Nie zaobserwowano natomiast, żadnych poważnych działań niepożądanych genisteiny. Publikacja oryginalna przedstawia poziomy wybranych transkryptów w płatach skóry i komórkach krwi obwodowej czterech pacjentów z łuszczycą leczonych przez 56 dni genisteiną (podawanie doustne). W pracy zdecydowano się zbadać 64 genów, których produkty białkowe zaangażowane są w metabolizm, aktywność przeciwbakteryjną, różnicowanie keratynocytów, powstawanie naczyń krwionośnych i produkcję cytokin. W przypadku skóry i krwi obwodowej zaobserwowano modulację



ekspresji niektórych genów zaangażowanych w procesy zapalne np. CCL4, CXCL10, IL1A, IL6. Zmiana w ekspresji tych genów przebiegała jednak różnie u badanych pacjentów (różnice między pacjentami). Z uwagi na niewielką liczbą ocenionych pacjentów należy te wyniki traktować z dużą ostrożnością. U części pacjentów zaobserwowano jednak obniżenie wskaźników nasilenia choroby tj. PASI (Psoriasis Area Severity Index) oraz BSA (Body Surface Area).

Doktorantka przedstawiła w oświadczeniach swój wkład w opisane prace, który polegał głównie na prowadzeniu hodowli komórkowych *in vitro* keratynocytów oraz monocytów, izolacji RNA z kultur komórkowych, przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji oraz reakcji qRT-PCR, wykonaniu analizy danych mikromacierzowych, oszacowaniu cytotoksyczności genisteiny, oznaczeniu poziomu reaktywnych form tlenu, oszacowaniu poziomu cytokin za pomocą testu ELISA, analizie aktywności kinazy PI3K, opracowaniu i walidacji modelu *in vitro* łuszczycy, przeprowadzeniu homogenizacji materiału pobranego od pacjentów oraz izolacji RNA z fragmentów skóry oraz komórek krwi obwodowych, analizie wyników i opracowaniu graficznym tabel i rycin oraz pisaniu oraz edycji manuskryptów. Doktorantka była w trzech przedstawionych publikacjach pierwszym autorem przy czym, w pierwszej pracy przeglądowej autorem z równorzędnym wkładem. Autorka nie była natomiast autorem korespondencyjnym w żadnej z przedstawionych publikacji. Mimo to, wkład Doktorantki w realizację przedstawionych badań i przygotowanie publikacji był dominujący. Praca doktorska została przygotowana starannie, tworzy logiczną całość a wyniki przedstawione w publikacjach mają dużą wartość naukową. Należy jednak zaznaczyć, iż zastosowany model *in vitro* łuszczycy oparty na transformowanej linii komórkowej keratynocytów HaCaT posiada pewne ograniczenia. Jak pokazały także badania kliniczne, przeniesienie wyników *in vitro* do praktyki klinicznej może być utrudnione. Stąd warto byłoby jednak wzbogacić te badania również o modele *in vitro* oparte na w komórkach pobranych bezpośrednio od pacjentów z łuszczycą. Odpowiedź komórek pobranych od pacjentów łuszczycowych mogłaby być bowiem odmienna w porównaniu do komórek HaCaT. Należy również pamiętać że modele *in vitro* nie odzwierciedlają w pełni złożonych interakcji międzykomórkowych *in vivo*, które odgrywają szczególną rolę w etiopatogenezie i rozwoju łuszczycy.



Chciałbym jednak zaznaczyć, że w realizację przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Doktorantka włożyła ogromny wkład pracy twórczej i laboratoryjnej. Zarówno merytoryczną, jak również metodologiczną stronę pracy oceniam bardzo wysoko. Autorka poprawnie sformułowała problem badawczy oraz dobrała odpowiednie metody i narzędzia badawcze. Przedstawione wyniki mogą stanowić nie tylko podstawę do badania ogólnego mechanizmu działania genisteiny, ale również być cennymi wskazówkami dla ośrodków zajmujących się opracowywaniem nowych leków dermatologicznych.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Elwiry Smolińskiej pt. „Molekularny mechanizm działania genisteiny w aspekcie jej potencjalnego zastosowania w leczeniu łuszczycy”, napisanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Elwiry Smolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom rozprawy oraz praktyczne możliwości zastosowania przedstawionych wyników badań, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n. med. Michał Pikuła