



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski
Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Kierownik : Prof. dr hab. n. med. Jacek Szepietowski
Ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław
Tel. +4871/327-09-41 Fax. +4871/327-09-42
e-mail: dermwen@umed.wroc.pl <http://www.derm.umed.wroc.pl>

Wrocław, 2019-10-20

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Koniecznego

pt. "Charakterystyka mysiego modelu badawczego *K14-Cre/Zc3h12a^{flox/flox}*

oraz rola białka MCPIP1 w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych naskórka"

Wiele chorób skóry na przewlekły i nawrotowy charakter. Sztandarową dermatozą jest łuszczyca, która dotyczy 2-3% ogółu populacji. Jej przewlekły zapalny charakter uwarunkowany jest szeregiem czynników zewnątrz i wewnątrzustrojowych. Mimo ogromnego postępu wiedzy i coraz to bardziej wnikliwych badań dotyczących patogenezy schorzenia nadal mechanizmy powstawania blaszki łuszcycowej pozostają nie w pełni poznane. Białko MCPIP1 uznawane jest za negatywny regulator stanu zapalnego wpływając na degradację mRNA cytokin prozapalnych. Będąc również negatywnym regulatorem czynników transkrypcyjnych bierze udział w licznych procesach komórkowych, włączając proces proliferacji i różnicowania komórek. Wszystkie powyższe mechanizmy są zaburzone w łuszczyce. Dlatego też ich zgłębianie ma ogromne znaczenie nie tylko poznawcze, ale zawsze, my klinicyści, oczekujemy, że badania o charakterze badań podstawowych w przyszłości znajdą przełożenie na szeroko rozumianą klinikę i dobro pacjentów. Badania na modelach zwierzęcych, posiadając swoje zalety i ograniczenia, są jednak podstawą uzyskania ważnych danych o procesach fizjologii, a przede wszystkim patofizjologii organizmu żywego. W nurt ten idealnie wpisuje się oceniana rozprawa doktorska. Temat rozprawy doktorskiej mgr Piotra Koniecznego mający na celu przybliżenie roli białka MCPIP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein -1 – induced protein 1*) w procesach zachodzących w naskórku, w

tym szczególnie tych odnoszących się bezpośrednio do mechanizmów patofizjologii łuszczycy uważam za jak najbardziej aktualny, trafny i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 117 stron oprawionego wydruku komputerowego, w tym 19 wielokrotnie złożonych rycin, 12 zestawień tabelarycznych i aż 315 pozycji piśmiennictwa, w większości pochodzącego z ostatnich lat. Za cenne uważam zamieszczenie na początku rozprawy wykazu skrótów, co ułatwia czytelnikowi śledzenie poszczególnych części rozprawy doktorskiej. Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej; zawiera wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski końcowe, wykaz bibliografii oraz streszczenie w języku polskim i języku angielskim (streszczenia zamieszczone na początku rozprawy).

Wstęp rozprawy doktorskiej składa się z kilku rozdziałów. Po przedstawieniu podstawowych danych odnoszących się do budowy i funkcji skóry Doktorant przybliżył czytelnikowi mechanizmy kontrolujące zarówno układ odpornościowy, jak i stan zapalny skóry, zwracając szczególną uwagę na rolę komórek samego naskórka – keratynocytów. Następnie omówił podłoże procesu łuszczycowego, epidemiologię, klinikę łuszczycy oraz odniósł się do nowoczesnej terapii przeciwłuszczycowej. W tej części wstępu, według mojej oceny, niektóre sformułowania są jednak zbyt daleko posuniętym skrótem myślowym. Doktorant między innymi podał, że zaczerwienione zmiany skórne w łuszczycy są spowodowane zwiększoną liczbą krętych naczyń włosowatych, które docierają do powierzchni naskórka. Proces tworzenia blaszki łuszczycowej jest jednak znacznie bardziej skomplikowany, a naczynia krwionośne włosowate nie docierają do powierzchni naskórka. Gdyby tak się działo to przecież mielibyśmy stałe krwawienie, przynajmniej drobnokropelkowe. W opisie metod leczniczych z wykorzystaniem tzw. terapii biologicznej zabrakło mi wspomnienia o lekach blokujących interleukinę 17 czy 23, a efalizumab czy alefacept nie są obecnie stosowane do leczenia łuszczycy. Zdaję sobie jednak sprawę, że Doktorant nie jest klinicystą, więc zrozumiałe jest, że Jego wiedza w tym zakresie może być nieco ograniczona. Docenić należy jednak próbę jak najlepszego przedstawienia zagadnienia. Za bardzo wartościowy należy uznać podrozdział o roli białka MCP1 w różnych procesach biologicznych, w tym w odpowiedzi immunologicznej, aktywacji keratynocytów, adipogenezy czy nowotworzeniu. Ta część wstępu jednoznacznie wskazuje, że mgr Piotr Konieczny jest wyjątkowo zorientowany we współczesnej wiedzy odnoszącej się do białka MCP1, będącego Jego głównym zainteresowaniem naukowym. Wstęp uważam za dobrze zaprojektowany i dobrze zredagowany. Stanowi istotne wprowadzenie czytelnika do dalszych części rozprawy doktorskiej.

Założenia i cele pracy zostały przedstawione w sposób jasny. Głównym celem badawczym Doktoranta była ocena roli białka MCPIP1 w procesie inicjacji i progresji łuszczycy oraz z procesie gojenia się ran. Aby można było to zrealizować mgr Piotr Konieczny najpierw postanowił dokonać analizy lokalizacji białka MCPIP w ludzkiej skórze zdrowej oraz prześledzić jego poziom w trakcie różnicowania ludzkich pierwotnych keratynocytów. Dodatkowo założył sobie przeprowadzenie charakterystyki mysiego modelu badawczego pozbawionego genu kodującego białko MCPIP1 w keratynocytach warstwy podstawnej naskórka. Badania zostały zaplanowane wzorowo. Wszystkie przedstawione przez Doktoranta szczegółowe cele badawcze zostały zrealizowane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej, prowadząc w konsekwencji do nowatorskich własnych spostrzeżeń. Obrazuje to, że mgr Piotr Konieczny posiadał umiejętność prawidłowego planowania badań naukowych oraz podkreśla rolę ośrodka, w którym badania zostały przeprowadzone.

Badania zostały przeprowadzone na materiale ludzkim i zwierzęcym. Doktorant uzyskał zgodę zarówno Komisji Bioetycznej UJ, jak i zgodę Komisji Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Wykorzystanie zwierząt genetycznie modyfikowanych było możliwe poprzez uzyskanie aprobaty Ministerstwa Środowiska. Materiał ludzki stanowiła skóra uzyskana podczas zabiegów z zakresu chirurgii plastycznej. Jako model zwierzęcy posłużyły dwa szczepy mysie o określonych profilu genetycznym sprowadzone z laboratoriów w Stanach Zjednoczonych i Niemczech. Oba szczepy były ze sobą krzyżowane aby uzyskać model myszy pozbawionej białka MCPIP1 w keratynocytach. Magister Piotr Konieczny do swoich badań zaproponował szereg zwierzęcych modeli eksperymentalnych, w tym model stanu zapalnego indukowanego imikwimodem, model stanu zapalnego indukowanego interleukiną 23, model gojenie się ran czy model *ex vivo* migracji keratynocytów. Wrażenie robi nie tylko szeroko zakrojony materiał wykorzystany w badaniach własnych, ale i wielce rozbudowana metodologia prowadzenia badań. Zastosowano różnorodne, właściwie wyselekcjonowane i dobrane, techniki badawcze, między innymi reakcją PCR w czasie rzeczywistym, technikę western blot, barwienia histologiczne standardowe i barwienie „Trichrome Massona”, barwienie immunohistochemiczne czy immunofluorescencyjne. Szczegółowy opis metod badawczych jest całkowicie poprawny i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Zwraca uwagę precyzyjna analiza statystyczna otrzymanych wyników z zastosowaniem dobrze wyselekcjonowanych testów. Znacznie uwiarygadnia ona przedstawione w dalszej części rozprawy wyniki własne Doktoranta. Osobiście jestem pod dużym wrażeniem zakrojonych eksperymentów, dobrze dobranego materiału i wyselekcjonowania odpowiednich technik badawczych. Cały rozdział uwidacznia ogrom pracy, który mgr Piotr Konieczny włożył w

uzyskanie ostatecznych wyników badań. Nadmienić należy badania własne Doktoranta stanowią kontynuację i pogłębienie badań realizowanych przez ośrodek Pani profesor Jolanty Jury.

Doktorant przedstawił wyniki pracy na przygotowanych złożonych rycinach oraz zaopatrzył słownym opisem. Zobrazowanie głównych wyników w formie graficznej wraz z ich słownym opisem umożliwia czytelnikowi z łatwością zrozumienie złożonych i wielowątkowych przesłanek pracy doktorskiej. Redakcja wyników może stanowić wzór dla innych badaczy realizujących swoje projekty badawcze, szczególnie o tak złożonej metodologii. Magister Piotr Konieczny, wśród licznych wyników badań, udokumentował wzrost ekspresji białka MCPIP1 w procesie różnicowania pierwotnych keratynocytów ludzkich, przy czym poziom mRNA MCPIP1 ulega obniżeniu. Lokalizacja białka MCPIP1 była obserwowana głównie w warstwach naskórka o dużej aktywności różnicowania komórek. Zaobserwował ponadto, że z oparciem o mechanizm regulacyjny aktywność RNazową MCPIP1, zwiększenie poziomu białka MCPIP1 w keratynocytach wpływa na zahamowanie ich proliferacji z jednoczesną aktywacją ich różnicowania. Bardzo istotnym nowatorskim spostrzeżeniem Doktoranta było stwierdzenie, że usunięcie genu kodującego białko MCPIP1 w warstwie podstawnej naskórka powoduje stopniowy, progresywny rozwój reakcji zapalnej. Objawia się to pojawieniem się zmian dysplastycznych w komórkach naskórka, obecnością komórek stanu zapalnego w skórze właściwej i aktywacją szeregu cytokin prozapalnych. Co ciekawe ma to wpływ również na rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego, obserwowano bowiem u zwierząt doświadczalnych powiększenie śledziony, powiększenie węzłów chłonnych oraz utratę masy ciała. W eksperymentalnym modelu łuszczycy mgr Piotr Konieczny wykazał, że brak białka MCPIP1 w keratynocytach indukuje ścieżkę sygnalizacyjną IL-17/IL23 oraz czynnika transkrypcyjnego Stat3. W mysim modelu gojenia się ran udokumentował, że białko MCPIP1 jest ważnym czynnikiem regulującym migrację keratynocytów przy uszkodzonej skórze. Należy jednoznacznie podkreślić, że badania Doktoranta doprowadziły do znaczącego poszerzenia wiedzy, nowatorskich obserwacji, dotychczas nie publikowanych w piśmiennictwie światowym.

Dyskusja wyników jest bardzo obszerna i dojrzała. Magister Piotr Konieczny z łatwością porusza się po zawikłych aspektach immunopatologii skóry. Potrafił krytycznie podejść do interpretacji otrzymanych własnych wyników badań i umiejętnie odnieść je do doniesień literaturowych. Doktorant umiejętnie przeanalizował wszystkie swoje spostrzeżenia naukowe. Omówienie uważam za całkowicie wyczerpującą i odpowiednio zredagowane.

Rozprawę wieńczą cztery przemyślane wnioski końcowe. Zostały one dobrze sformułowane. Zawarte w nich treści w pełni odzwierciedlają wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta własnych badań. Jako ciekawe i dojrzałe odnajduję przedstawienie zagadnień, które mgr Piotr Konieczny widzi jako możliwe i konieczne w dalszych badaniach nad zgłębianiem roli białka MCPIP1. Twierdzi, że wyniki własne nasuwają dalsze pytania, proponuje ciekawe kolejne cele badawcze. Może dla przejrzystości komunikatu dobrze byłoby również zamieścić i te pytania. Mam wielką nadzieję, że ten fragment rozprawy jest deklaracją Doktoranta do dalszej pracy naukowej, do której jest po badaniach stanowiących rozprawę doktorską bardzo dobrze przygotowany.

Piśmiennictwo rozprawy jest bardzo bogate. Magister Piotr Konieczny wykorzystał liczne prace anglojęzyczne, które trafnie wyselekcjonował w odniesieniu do własnego materiału. Nadmienić należy, że część cytowanej literatury pochodzi z macierzystej jednostki Doktoranta. Świadczy to nie tylko o uważnym śledzeniu piśmiennictwa z zakresu omawianej tematyki przez mgr Piotra Koniecznego, ale o kontynuacji myśli naukowej jednostki.

Reasumując, oceniam rozprawę mgr Piotra Koniecznego bardzo wysoko. Jest to cenna pozycja głównie pod względem poznawczym. Całość pracy dokumentuje, że Doktorant posiadał odpowiednie umiejętności i jest przygotowany do prowadzenia prac badawczych. W mojej ocenie zaprojektowane i zrealizowane badania znacząco przekraczają osiągnięcia konieczne do standardowej rozprawy doktorskiej.

Na tej podstawie stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr Piotra Koniecznego pt. „Charakterystyka mysiego modelu badawczego $K14-Cre/Zc3h12d^{lox/lox}$ oraz rola białka MCPIP1 w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych naskórka” spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie moją wysoce pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie mgr Piotra Koniecznego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny przedstawionego projektu badawczego i fakt, że rozprawa doktorska wnosi nowatorskie dane do współczesnego stanu wiedzy zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy mgr Piotra Koniecznego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA KLINICZNA DERMATOLOGII,
WENEROLOGII I ALERGOLOGII
Prof. dr hab. n. med. Jacek Szepietowski
prof. dr hab. Jacek Szepietowski