

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych  
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 3 października 2021 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. **Dawida Wnuka** pt.: "Rola szlaku(ów) TGF- $\beta$ /Smad w fenotypowym przejściu ludzkich fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty" wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Michalik z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Astma oskrzelowa to przewlekła choroba oskrzeli, dotykająca znaczną część populacji naszego globu. Ta groźna i podstępna choroba rozwija się wskutek chronicznego stanu zapalnego oskrzeli, prowadzącego do zmian w ścianie oskrzeli objawiających się zwężeniem światła oskrzeli i trudności z oddychaniem. Pomimo powszechności astmy wciąż niewiele wiadomo o mechanizmach jej rozwoju, a więc wciąż nie ma leków celujących w przyczynę(y) tego schorzenia. Dostępne jest jedynie leczenie objawowe, oparte głównie o wziewne sterydy. Istnieje więc pilna potrzeba poznania mechanizmów rozwoju astmy, co może pomóc w opracowaniu nowych, skutecznych terapii. Wśród pionierów w tych badaniach jest zespół Zakładu Biologii Komórki z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, którego aktywnym członkiem jest promotor przedstawionej mi do recenzji rozprawy mgr. Dawida Wnuka, dr hab. Marta Michalik. Po jej opiece Doktorant uzyskał nowatorskie wyniki, wskazujące na różnice w szlakach sygnałowych w fibroblastach oskrzelowych pochodzących od osób cierpiących na astmę i tych, pacjentów z zaburzeniami w górnych drogach oddechowych, którzy nie są astmatykami, co może stanowić podstawę do opracowania nowych, selektywnych terapii.

### Formalny opis rozprawy

Rozprawa została przygotowana w formie klasycznej monografii o układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Część merytoryczna liczy 170 stron i rozpoczyna się opisem dorobku publikacyjnego Doktoranta oraz informacjami o finansowaniu prowadzonych przez niego badań; po nich następuje czterostronicowy wykaz (indeks) stosowanych skrótów, trzystronicowe streszczenia (w języku polskim i angielskim) oraz spis treści. Wstęp liczy 30 stron i zawiera 7 rycin oraz 3 tabele, po nim znajdują się założenia i cele pracy. Kolejny rozdział to Materiały i Metody, na który składają się 32 strony zawierające 5 rycin/schematów i 14 tabel. Wyniki liczą 40 stron i zawierają 30 złożonych rycin; po nich następuje 21.-stronicowa dyskusja, zawierająca jedną rycinę/schemat i tabelę. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa, na które składa się 449 pozycji (głównie z obecnego stulecia) oraz wykazem rycin i tabeli przedstawionych w rozprawie.

## Ocena merytoryczna

Indeks skrótów jest wyczerpujący, nie mam zastrzeżeń do większości z nich, podoba mi się podanie pełnych nazw w języku angielskim. Mam jednak kilka wątpliwości, co do niektórych tłumaczeń na język polski - np. wydaje mi się, że prawidłowe tłumaczenie JNK to kinaza końca aminowego białka c-Jun; *long-acting* w przypadku leków - to przedłużone działanie; nie podoba mi się też sformułowanie bezsurowicza w odniesieniu do pożywki hodowlanej Opti-MEM Reduced Serum Media. Doktorant nie wydaje się być zdecydowany jak tłumaczyć bovine - raz jest bydłęca (przy BSA; moim zdaniem prawidłowo), a raz wołowa - przy FBS.

Wstęp, stanowiący wprowadzenie w tematykę prowadzonych badań, to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o epidemiologii astmy oskrzelowej w Polsce i na świecie, w tym elementów farmakoekonomiki i terapii, oraz o mechanizmach rozwoju tej uciążliwej i bardzo groźnej choroby na poziomie komórkowym - fenotypowe przejście fibroblastów w miofibroblasty, FMT) i molekularnym - czynniki/szlaki sygnałowe stymulujące jej rozwój. Sporo miejsca poświęca tu Doktorant związkom chemicznym, które były lub mogą być potencjalnie zastosowane w terapii astmy (m.in. metyloksantynom i fenofibratowi). Nie mam zasadniczych uwag do tej części pracy, jest ona napisana żywym językiem, w sposób czytelny i zrozumiały, jest też bogato ilustrowana, co znacznie ułatwia lekturę tego wielowątkowego rozdziału.

Cel pracy, którym była weryfikacja hipotezy, że indukowana aktywacja szlaków przekazywania sygnału poprzez szlak(i) białek Smad różni się w fibroblastach oskrzelowych uzyskanych od astmatyków (AS) i nieastmatyków (NA), a aktywacja tego szlaku sprzyja nasilonemu FMT u osób cierpiących na astmę. Doktorant postawił sobie następujące cele szczegółowe/zadania badawcze: (i) porównanie na poziomie molekularnym aktywności szlaku białek Smad w komórkach pochodzących od AS i NA oraz próbie wyjaśnienia przyczyn powodujących nasilenie procesu FMT u AS, indukowanego przez czynnik TGF- $\beta$ 1; (ii) porównanie w hodowlach 3D efektywności FMT, stymulowanego przez TGF- $\beta$ 1 i zaangażowania w tym procesie białek Smad; (iii) poszukiwanie związków chemicznych o potencjalnym działaniu terapeutycznym, zaangażowanych w regulację szlaków związanych i niezwiązanych ze szlakiem białek Smad; (iv) próba wyjaśnienia powiązań funkcjonalnych pomiędzy nabłonkiem oskrzelowym i fibroblastami oraz analiza ich wpływu na FMT fibroblastów oskrzelowych w modelu ko-hodowli komórek pochodzących od AS i NA, która do pewnego stopnia odzwierciedla czynnościową jednostkę nabłonkowo-mezenchymalną w oskrzelach.

Dla realizacji tych ambitnych zamierzeń Doktorant wykorzystał komórki pochodzące od AS i NA; należy podkreślić, że dość szczegółowo opisał populację obu grup pacjentów, przy czym grupa NA była trzykrotnie mniej liczebna; zastanawiam się z czego to wynikało? Brakuje mi też informacji o wielkości pobranych wycinków, czy zawsze były pobierane z tej samej części oskrzeli? Do analizy uzyskanego materiału Doktorant wykorzystał szereg metod badawczych, wyczerpująco opisanych i często też zilustrowanych w rozdziale Materiały i Metody. Acz zdarzają się lapsusy; np. PageRuler Doktorant definiuje jako marker wielkości białek, podczas gdy chodzi tu raczej o masę tych białek, a nie parametry fizykochemiczne. Liczba wykorzystanych metod i podejść doświadczalnych jest imponująca, nie będę ich tu wymieniać, wspomnę jedynie, że są to zarówno rutynowe techniki badawcze powszechnie stosowane przez biologów komórki, jak i bardziej wyrafinowane, dostosowane do potrzeb badawczych Doktoranta, np. hodowla *in vitro* komórek nabłonka oskrzelowego na granicy powietrze płyn. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej, z dostosowaniem rodzaju testu do konkretnych danych, co zostało tu wyjaśnione. Wysoko oceniam tę część rozprawy.

W bardzo obszernym (aż 40 stron) rozdziale Wyniki Doktorant opisuje uzyskane przez siebie dane; lektura tego rozdziału pozwala na stwierdzenie, że udało mu się w pełni zrealizować postawione sobie cele. W toku żmudnych i czasochłonnych doświadczeń Doktorant jako pierwszy wykazał, że zwiększone FMT fibroblastów oskrzelowych uzyskanych od AS po stymulacji przez TGF- $\beta$ 1 wynika z zaburzonej równowagi pomiędzy aktywnością szlaku proz włóknieniowego TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 i przeciwz włóknieniowego Smad1/5(8)/9. Ten pierwszy jest nasilony u AS, zaś ten drugi u NA. Zaobserwował także, iż modulacja poziomu ekspresji genów kodujących Smad1 i koneksyny-43 wpływa na tę równowagę poprzez regulację aktywności szlaków zaangażowanych w FMT. Co więcej wykazał, że modulacja szlaku proz włóknieniowego w fibroblastach AS przez związki z grupy metyloksantyn i fibratów może mieć potencjał terapeutyczny w hamowaniu procesu FMT. Badania Doktoranta wskazują również, że inne czynniki, takie jak np. białko BMP-7 i izolikwirytygenina mogą stymulować szlaki przeciwz włóknieniowe, co też może być rozważane jako potencjalna terapia. Doktorant testował też związki z grupy chalconów i wykazał, że one również hamują FMT. Wskazał również inne związki, działające na drodze niezależnej od szlaków Smad takie, jak np. inhibitory kinazy zależnej od białka RhoA, które regulują organizację cytoszkieletu aktynowego. Należy również podkreślić, że opracowane przez Doktoranta modele eksperymentalne - tzn. hodowla komórek 3D oraz wspomniana już ko-hodowla fibroblastów z komórkami nabłonka oskrzelowego - dostarczają narzędzia badawczego, które będzie mogło być wykorzystane w testowaniu potencjalnych terapeutyków, celujących w mechanizmy rozwoju astmy.

Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną przedstawionych w rozprawie wyników, acz Doktorant nie ustrzegł się od drobnych uchybień. Otóż na początku Wyników (strona 83) Doktorant podaje, że wybrał 10 populacji HBF od AS i NA, czy to oznacza po 10 z każdej z grupy? Jeśli tak, to skąd wzięły się trzy populacje NA, bo jak wynika z Materiałów i Metod komórki NA były pobrane od siedmiorga pacjentów? Zauważyłam też brak odniesienia w tekście do wyników przedstawionych na Ryc. 13E i F.

Mimo tak obszernego materiału tę część pracy czytało się dość dobrze, do czego z pewnością przyczyniło się umieszczenie na końcu każdego podrozdziału jednozdaniowego podsumowania/wniosku. Dużo gorzej było niestety ze stroną wizualną, bardzo wiele rycin, zwłaszcza mikrografii było po prostu zbyt małych lub o nienajlepszej jakości, praktycznie uniemożliwiających weryfikację tego co Doktorant opisał w tekście; dotyczy to zwłaszcza Ryc. 20. Nie wiem, z czego wynikała ta „oszczędność”, bo akurat długość rozprawy doktorskiej nie powinna być limitowana. Uważam to za minus skądinąd świetnej rozprawy.

Dyskusja jest wyjątkowo długa, liczy bowiem aż 21 stron. Jest bardzo dobrze napisana, podzielona na segmenty, opatrzone śródtytułami, co ułatwia lekturę tej części rozprawy. Doktorant szczegółowo omawia swoje wyniki w oparciu o dane literaturowe, nie stroniąc od wskazania potencjału aplikacyjnego/terapeutycznego swoich odkryć. Dyskusję kończy krótkie podsumowanie (nazwałabym to raczej wnioskami), zawierające rycinę/schemat stanowiącą résumé uzyskanych przez Doktoranta wyników. Ta część rozprawy z pewnością wskazuje na dojrzałość naukową Autora rozprawy. Ciekawi mnie, czy Doktorant zastanawiał się, czy uzyskane przez niego wyniki, wykorzystujące materiał pochodzący od dorosłych osobników, mogą być odniesione do dzieci. Bo przecież astma zaczyna rozwijać się już we wczesnym dzieciństwie.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca jest zredagowana w sposób staranny, napisana poprawną polszczyzną. Doktorant nie ustrzegł się jednak od literówek (które wpływają na znaczenie – np. w ranach zamiast w ramach) i kalek z

języka angielskiego. Poza klasycznym wiązaniem się czegoś do czegoś zamiast czegoś z czymś, najbardziej razi mnie nadużywanie słowa balans w miejsce równowagi. Przecież nawet po angielsku jest piękne słowo *equilibrium*... Pragnę również przypomnieć, że kinaza ROCK nie fosforyluje białka RhoA, a jedynie jest przez to białko aktywowana; stąd prawidłowa nazwa to kinaza zależna od Rho. Zdaję sobie jednak sprawę, że przy tak obszernym materiale mało kto ustrzeże się od błędów i uchybień.

## **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pana mgr. Dawida Wnuka ma bardzo dużą wartość poznawczą, dostarczyła bowiem nowych informacji o mechanizmach rozwoju astmy oskrzelowej. Doktorant jako pierwszy wykazał, że jedną z przyczyn przejścia fenotypowego fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty, co w konsekwencji skutkuje zwężeniem światła oskrzeli, jest zaburzona równowaga pomiędzy aktywnością szlaku proz włóknieniowego TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 i przeciwz włóknieniowego Smad1/5(8)/9. Doktorant wskazał czynniki/związki, które mogą wpływać na tę równowagę i przesunąć ją u astmatyków w kierunku szlaku przeciwz włóknieniowego. Jego badania mają z pewnością duży potencjał aplikacyjny, wskazując na ścieżki przekazywania sygnałów, które mogą być celem terapeutycznym w przyczynowym, a nie jak dotychczas objawowym, leczeniu tego niebezpiecznego schorzenia. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią przyczynek do dalszych badań. Znaczna część wyników Doktoranta została przedstawiona w dwóch artykułach pierwszoautorskich opublikowanych w *Scientific Reports* (5-IF>5) oraz w *Acta Biochimica Polonica* (5-IF>2). Doktorant jest również współautorem 16. innych publikacji, przy czym trzy z nich są bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej. Doktorant na swoje badania uzyskał z NCN grant Etiuda oraz trzy tzw. uczelniane granty wewnętrzne, kierowane do doktorantów i młodych badaczy. To bardzo dobry dorobek, wskazujący na jego zaangażowanie w pracę badawczą oraz dojrzałość naukową.

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wymienione w recenzji uchybienia i nieścisłości nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy. Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Dawida Wnuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Jednocześnie z uwagi na dużą wartość merytoryczną wyników uzyskanych przez mgr. D. Wnuka i potencjał aplikacyjny tychże wyników wnioskuję o jej wyróżnienie. Zaznaczam jednak, że czynię to warunkowo. Podtrzymanie wniosku uzależniam bowiem od przedstawienia w trakcie obrony rycin o jakości niebudzącej wątpliwości co do przedstawionych w nich wyników.

Maria Jolanta Rędownicz