



Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 18.12.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Moniki Karoliny Majchrzak-Góreckiej

**p.t.: „Rola wydzielniczego inhibitora proteaz leukocyтарnych (SLPI)
w mysim modelu łuszczycy”**

przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Cichy
w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Głównym celem rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Moniki Karoliny Majchrzak-Góreckiej było poznawanie mechanizmów powstawania łuszczycy, a opisane badania były wykonane z użyciem jednego z mysich modeli tej chronicznej i nieuleczalnej choroby. Łuszczycę charakteryzuje się złożoną etiologią i nadal nie znamy dokładnych zależności jak na jej powstanie i przebieg wpływają liczne czynniki genetyczne i środowiskowe. Z tego względu dalsze badania, również w zakresie podjętym przez Doktorantkę, są w pełni uzasadnione. Ciekawym punktem wyjścia do badań były doniesienia o możliwym udziale neutrofilów i tworzonych przez nie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET) w patogenezie łuszczycy. Doktorantka skupiła się w szczególności na wydzielniczym inhibitorze proteaz leukocyтарnych (SLPI), białku produkowanym m. in. przez neutrofile, i jego możliwej funkcji modulującej przebieg choroby. W trakcie badań pani mgr inż. Majchrzak-Górecka opracowała metodę analizy ilościowej obrazów mikroskopowych zmian skórnych, a następnie zastosowała ją w praktyce w modelu łuszczycopodobnego zapalenia skóry opartego o stosowanie kremu Aldara, u myszy typu dzikiego i myszy z inaktywowanym genem kodującym białko SLPI. Głównym odkryciem Doktorantki było stwierdzenie zależności między brakiem białka SLPI a mniejszym nawodnieniem skóry, co może przekładać się na zwiększoną reakcję zapalną w przypadku mechanicznych uszkodzeń skóry.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa liczy 114 stron maszynopisu, jest napisana w języku polskim i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się wykazem skrótów, streszczeniami w języku polskim i angielskim, po których następuje Wstęp teoretyczny (31 stron) podzielony na 6 podrozdziałów. Po jednostronicowym określeniu Celów pracy, Materiały i metody zawarto na 11 stronach. Wyniki (38 stron) są podzielone na 5 podrozdziałów. Dyskusja liczy 7 stron i 6 podrozdziałów, z których ostatni stanowi Podsumowanie. Bibliografia zawiera 392 pozycje literaturowe.

Ocena merytoryczna

Wstęp teoretyczny został bardzo dobrze przygotowany i stanowi obszerny, kompletne i ciekawe wprowadzenie do całości tematyki badań prezentowanych w rozprawie. Doktorantka przedstawia kolejno budowę zdrowej skóry ludzkiej, skórny układ odpornościowy, neutrofile i sieci NET, charakterystykę białka SLPI, opis łuszczycy i mysich dermatoz łuszczycopodobnych stosowanych jako modele tej choroby. Wstęp jest ilustrowany dwoma rycinami i tabelą. Dobór przedstawionych treści jest właściwy, a ich prezentacja logiczna i jasna. Wstęp dokumentuje bardzo dużą wiedzę Doktorantki, bardzo wysoko go oceniam i nie mam do niego uwag.

Cel pracy („zbadanie roli pełnionej przez białko SLPI w łuszczycy, poprzez opis jego działania w mysim łuszczycopodobnym zapaleniu skóry”) został osiągnięty poprzez realizację czterech poprawnie sformułowanych celów szczegółowych.

W kolejnym rozdziale opisano **Materiały i metody**. Te ostatnie obejmowały przede wszystkim procedury wykonywane na myszach laboratoryjnych, w celu pozyskania materiału do badań, oraz rozbudowane metody obrazowania za pomocą mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej. Generalnie opis zastosowanych metod jest dokładny, ilustrowany trzema rycinami oraz jedną tabelą. W tej części mam kilka uwag. Zabrakło mi informacji jak wykonywano pomiary przelnaskórkowej utraty wody (TEWL) – w Materiałach wymieniono jedynie model użytego sprzętu jako „Tewameter® TM 300 oraz MPA-6 (Bechtold)” – ale sposób wykonywania pomiarów nie jest oczywisty dla niespecjalisty. Nie zrozumiałam również z opisu w rozdziale 7.2.1.1 jak mierzono grubość skóry (odnoszę się do zdania: „W eksperymentach prowadzonych na myszach z tego samego miotu dokonywana była również: ocena nasilenia zmian skórnych oraz pomiar przelnaskórkowej utraty wody (TEWL) i grubości smarowanej skóry w ostatnim dniu eksperymentu.”). O ile pomiary TEWL musiały być prowadzone na żywym organizmie, z późniejszych wyników (np. Ryc. 8) wnioskuję, że grubość skóry była mierzona po pobraniu, wybarwieniu i obrazowaniu tkanki – co nie jest jasne z opisu metody. Wreszcie, rozbić treści dotyczących obrazowania na dwa punkty: 7.2.2.3 Analiza tkanek za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz 7.2.2.3.3 Akwizycja obrazów mikroskopowych, nie wydaje się potrzebne – zakładając, że punkty te dotyczą tej samej procedury ich treści powinny być przedstawione razem.

Uzyskane **Wyniki** przedstawiono w sposób logiczny, jako spójny ciąg doświadczeń realizujący 4 założone cele szczegółowe. Wyniki przedstawiono na 27 rycinach i w 1 tabeli. Z najważniejszych osiągnięć należy wymienić, że Doktorantka opracowała oraz zweryfikowała poprawność algorytmu do zliczania obiektów (komórek) na podstawie obrazów mikroskopowych skóry, poprzez jego porównanie i wykazanie lepszego działania w stosunku do wcześniej opublikowanej metody innych badaczy. Algorytm ten stanowi z pewnością bardzo użyteczne narzędzie do dalszych badań zespołu prof. Cichy. W kolejnych częściach rozprawy Doktorantka opisuje użycie algorytmu do analiz skóry myszy z zapaleniem skóry wywołanym smarowaniem kremem Aldara, zarówno myszy typu dzikiego (SLPI^{+/+}) jak i myszy z inaktywowanym genem kodującym białko SLPI (SLPI^{-/-}). Wśród tych analiz, mierzono przede wszystkim kinetykę nacieku leukocytów oraz tworzenia sieci NET w łuszczycopodobnych zmianach skórnych, a na ostatnim etapie oceniono także wpływ śródskórnego podania rekombinantowego białka SLPI (z użyciem PBS jako kontroli) w obu szczepach myszy. O ile dla większości badanych parametrów nie wykazano znaczących różnic pomiędzy myszami SLPI^{+/+} oraz SLPI^{-/-}, to ciekawą obserwacją było zwiększenie transepidermalnej utraty wody – czyli zmniejszone nawodnienie –

w skórze sąsiadującej z obszarem traktowanym kremem Aldara. Możliwa funkcja białka SLPI w regulacji nawodnienia skóry, jak więc, jak podkreśla sama Doktorantka w Podsumowaniu, „najważniejszym osiągnięciem poznawczym zaprezentowanych badań”.

Oceniając zaprezentowane wyniki chcę podkreślić poprawność zaplanowania i przeprowadzenia doświadczeń na trudnym materiale zwierzęcym, wykazującym dużą zmienność osobniczą pod względem przebiegu zapalenia skóry. Pozyskanie materiału do badań wymagało niewątpliwie dużego nakładu pracy, podobnie jak i dalsze etapy badań analitycznych. Doświadczenia zawierały niezbędne próby kontrolne, a przedstawione wyniki zostały właściwie zinterpretowane. Mogę sobie wyobrazić, że Doktorantka prawdopodobnie liczyła na bardziej znaczące różnice w analizowanych parametrach pomiędzy oboma szczepami myszy, ale tzw. „wyniki negatywne” nie umniejszają wartości przeprowadzonych badań, które uznaję za wykonane poprawnie i zgodnie ze sztuką.

Mam kilka uwag lub wątpliwości do tej części rozprawy:

- Ryc. 11: Na podstawie obrazów przedstawionych jako porównanie działania algorytmu Doktorantki oraz algorytmu innych badaczy, tak znacząca (niemal dwukrotna) różnica w przypisaniu jąder komórkowych nie jest widoczna. W legendzie czytamy, że „Grotami strzałek oznaczono przykładowe nieprawidłowo zliczone jądra komórkowe”, ale nie jest dla mnie jasne na które jądra bądź ich części wskazują strzałki. W legendzie jest też odnośnik do nieistniejącej pozycji literaturowej [460], zakładam, że chodzi o pozycję [367].

- Str. 64: „przyjęto, iż pozytywne względem danego markera są komórki, w których występuje kolokalizacja sygnału pochodzącego od Hoechst i analizowanego markera w co najmniej 15%.” Do czego dokładnie odnosi się 15%? Powierzchni ROI, czy innego parametru?

- Ryc. 15: kanał zielony fluorescencji (znakowanie NET) jest zupełnie niewidoczny na przedstawionych złożeniach – w takim przypadku potrzebna byłaby osobna prezentacja kanałów składających się na złożenie, tak jak na Ryc. 18. W legendzie do Ryc. 15 powinien znaleźć się opis na co wskazują żółte grotty (opis taki jest tylko w głównym tekście).

- Generalnie w rozprawie zabrakło mi przedstawienia obrazów pokazujących kolokalizację sygnałów markerów neutrofilii (Ly6G) i sieci NET (cytrulinowany histon H3). Jak duża proporcja neutrofilii tworzyła sieci zewnątrzkomórkowe w badanych preparatach w różnych warunkach eksperymentalnych? Ponadto, co oznacza sygnał cytrulinowanego histonu H3, który nie kolokalizuje z markerem neutrofilii, np. zielony sygnał, który nie pokrywa się z sygnałem czerwonym (Ly6G) na Ryc. 18?

- Na niektórych rycinach zamieszczenie dodatkowo powiększeń pewnych fragmentów obrazów mikroskopowych poprawiłoby ich odbiór i umożliwiło dokładniejsze śledzenie szczegółów morfologicznych, np. Ryc. 24 czy 26.

Rozprawę zamyka **Dyskusja**, która jest bardzo dojrzałym, krytycznym i profesjonalnym omówieniem uzyskanych wyników i ich znaczenia w kontekście danych innych badaczy z zespołu prof. Cichy oraz dostępnej literatury. Struktura Dyskusji, podzielonej na 5 podrozdziałów tematycznych, odpowiada 5 rozdziałom Wyników, ale – co bardzo istotne – nie jest ich powtarzaniem ani powielaniem podanych wcześniej informacji. Dyskusję czyta się bardzo dobrze, jest napisana ciekawie i przedstawia szerokie tło badań, zwłaszcza nad zmianami w układzie odpornościowym w przebiegu łuszczycy. Doktorantka formułuje interesujące interpretacje wyników swoich badań, np. w kontekście niedawno opisanej „antycypującej

wrodzonej odporności rejonów przyległych” (ang. anticipatory immunity), o której dowiedziałam się czytając rozprawę. W Dyskusji określono także kierunki możliwych dalszych prac. Ta część rozprawy, podobnie jak Wstęp, dokumentuje rozległą wiedzę Doktorantki w tematyce swoich badań, ale także umiejętność formułowania hipotez, kojarzenia faktów i wykorzystywania ich do interpretowania własnych wyników. Również tę część rozprawy oceniam bardzo wysoko. Jedyna drobna uwaga edytorska, str. 85 w zdaniu „ekspresja SLPI jest największa i osiąga poziom średnio ok. 80 wyższy niż w dniu 0” zabrakło jednostki – po sprawdzeniu odnośnika literaturowego dowiedziałam się, że chodziło o określenie 80 razy, a nie 80% jak pierwotnie podejrzewałam.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana starannie, poprawnym i zwięzłym językiem polskim, z nielicznymi błędami literowymi. Z niedociągnięć edytorskich można zauważyć częste braki odstępów między cyfrą a jednostką miary. Ponadto, w wielu miejscach słowo „ilość” (oznaczające coś niepoliczalnego, ang. amount) jest używane nieprawidłowo (choć powszechnie w potocznej polszczyźnie) w odniesieniu do obiektów policzalnych, dla których prawidłowym określeniem jest „liczba” (np. komórek, jąder, zwierząt, itp. – ang. number).

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Moniki Karoliny Majchrzak-Góreckiej podejmuje istotny temat badawczy jakim jest udział neutrofilii i białka SLPI w patogenezie łuszczycy. Przeprowadzone badania świadczą o tym, iż Doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną w tematyce swoich badań, biegłość techniczną w planowaniu i wykonywaniu doświadczeń realizujących założone cele oraz umiejętność prawidłowej analizy i wyciągania wniosków z rezultatów eksperymentów. Wyniki przedstawione w rozprawie stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Na podkreślenie zasługuje także sprawność napisania rozprawy i umiejętność prowadzenia logicznego wywodu.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr inż. Moniki Karoliny Majchrzak-Góreckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.