



Prof. dr hab. Magdalena Klink, prof. IBM
Instytut Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk
Lodowa 106, 93-232 Łódź

Łódź, dn. 17.05.2019

OCENA

rozprawy doktorskiej mgra Damiana Jacenika pt. Sygnalizacja estrogenowa w chorobach zapalnych jelit

Choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego należą do grupy nieswoistych chorób zapalnych jelit. Ich etiologia nie została jednoznacznie określona jednak sugeruje się, że jest wynikiem wzajemnych interakcji między czynnikami genetycznymi, immunologicznymi oraz środowiskowymi. W przypadku podłoża genetycznego szczególnie znaczenie ma obecność tzw. genów podatności, wśród których geny *NOD2/CARD15* czy *IL23R* wydają się być kluczowe. Według teorii immunologicznej stan zapalny i przedłużająca się nadmierna aktywacja komórek układu odpornościowego w jelicie wywoływane są niepoznanym dotąd antygenem bakteryjnym lub wirusowym czy też alergenem pochodzenia pokarmowego. Czynnikiem środowiskowy to przede wszystkim niewłaściwy skład mikroflory jelitowej charakteryzujący się zwiększeniem liczby bakterii rodzaju *Bacteroides* w stosunku do rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus*. Dostępne informacje na temat etiologii chorób zapalnych jelit absolutnie nie wyczerpują tematu i wciąż poszukuje się nowych czynników, które pozwoliłyby wnikliwiej poznać patomechanizm tych chorób i dały nadzieję na efektywne leczenie. W ostatnich latach zaczęto zwracać uwagę na związek między stosowaniem antykoncepcji hormonalnej oraz hormonalnej terapii zastępczej a rozwojem nieswoistych chorób zapalnych jelit. Chociaż dane nie są jednoznaczne, wiele badań wskazuje na zwiększone ryzyko zapadalności na Chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego u kobiet stosujących suplementację hormonalną. Okazało się, że estrogeny i wiążące je receptory mają silnie immunomodulacyjny charakter i są potencjalnie ważnym elementem w nieswoistych chorobach zapalnych jelit.

Przedłożona mi do oceny praca doktorska mgra Damiana Jacenika dobrze wpisuje się w nurty poszukiwań mechanizmów regulujących stan zapalny jelit. Doktorant podjął się wieloparametrycznej oceny udziału sygnalizacji estrogenowej w chorobie Leśniowskiego-

Crohna i we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Wybór tematu pracy uważam za trafny i w pełni uzasadniony. Tym bardziej, że związek między hormonami płciowymi i ich receptorami, a chorobą zapalną jelit jest obecnie „gorącym” nurtem badawczym. Niewątpliwą zaletą rozprawy jest zastosowanie dwóch modeli: materiału klinicznego pochodzącego od pacjentów zarówno mężczyzn jak i kobiet z nieswoistym zapaleniem jelit jak i mysiego modelu choroby Leśniowskiego-Crohna. Mając na uwadze fakt, że zmiany hormonalne w okresie pomenopauzalnym u kobiet mogą znacząco wpływać na sygnalizację estrogenową, Doktorant słusznie postanowił grupę kobiet podzielić na dwie przed i po pięćdziesiątym roku życia. Ponadto, co w szczególności wymaga podkreślenia, mgr Jacenik szczególną uwagę zwrócił na rolę receptora estrogenów oddziałującego z białkami G, którego udział w chorobach zapalnych jelit jest prawie nieznan.

Rozprawa doktorska, licząca 110 stron, została przygotowana w postaci monografii o tradycyjnym układzie tekstu dla prac przyrodniczych. Monografia opracowana jest bardzo starannie pod względem językowym, edytorskim i stylistycznym. Czyta się ją z dużą przyjemnością.

W rozdziale Wstęp Doktorant scharakteryzował receptory estrogenów dwa jądrowe i jeden oddziałujący z białkami G, wzajemne interakcje między nimi i przedstawił dostępne dane na temat ich znaczenia w chorobach zapalnych jelit i nowotworach jelita grubego. Omówił również ryzyko zachorowalności na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego u kobiet w zależności od wieku i przyjmowania suplementacji hormonalnej. Rozdział ten ma charakter krytycznego przeglądu opublikowanych badań na modelach *in vitro* oraz *in vivo* i świadczy o doskonałej znajomości tematu przez Doktoranta. W tym miejscu chciałbym spytać mgra Jacenika gdzie w jelicie grubym występują receptory estrogenowe, w komórkach układu odpornościowego, komórkach nabłonkowych? Zainteresowało mnie również czy estrogeny wiążą się do różnych typów receptorów z taką samą preferencją? W rozdziale Wstęp Recenzentowi zabrakło jednak szerszego omówienia stanu zapalnego chorób jelit będących tematem rozprawy tym bardziej, że znakomita część wyników dotyczy przeciwwzapalnego działania sygnalizacji estrogenowej w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Ciekawym uzupełnieniem tego rozdziału byłoby także omówienie estrogenów ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu ich działania. Myślę również, iż przedstawienie szlaków przekazywania sygnałów inicjowanych przez różne receptory estrogenowe mogłoby być bardziej szczegółowe. Takie opracowanie teoretyczne byłoby dobrym wprowadzeniem do celów pracy i niewątpliwie pomogło by w śledzeniu i analizie wyników. Natomiast część opisanych we wstępie badań na temat sygnalizacji estrogenowej

mogłaby być z powodzeniem przeniesiona do dyskusji. Nie mniej jednak przedstawiony przez Doktoranta przegląd literatury jest interesujący i daje pogląd jakie badania w temacie sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit są obecnie prowadzone i jak dużo jest jeszcze do zbadania.

Cel pracy został jasno sformułowany. Doktorant w kilku punktach przedstawił plan swoich badań. Chciałabym mu pogratulować podejścia do tematu i wyboru dwóch modeli badawczych.

W rozdziale Materiały i Metody mgr Jacenik wyczerpująco opisał stosowane przez siebie techniki badawcze, co ułatwiło późniejsze śledzenie otrzymanych wyników. Na podkreślenie zasługuje imponujące spektrum nowoczesnych metod, którymi posługiwał się Doktorant. Recenzenta zaciekało natomiast dlaczego biopsje jelita grubego pacjentów były pobierane z miejsca niezapalnego? Mam też pytanie czy krew na surowicę była pobierana tego samego dnia co biopsje?

Wyniki przeprowadzonych badań opisano na 34 stronach, zaprezentowano w 1 tabeli i zilustrowano w formie 24 rycin, które są czytelne, przejrzyste i zawierają wszystkie niezbędne informacje. Zabrakło mi jedynie wyjaśnienia skrótu ODI na wykresach przedstawiających analizę densytometryczną białek wykrywanych metodą western blot. Moim zdaniem pod wykresami powinna się też znaleźć adnotacja jakim testem wyliczono znamienność statystyczną. Należy natomiast podkreślić, że Doktorant posługiwał się szerokim wachlarzem technik laboratoryjnych. Na uznanie zasługuje również dojrzały styl w jakim opisane zostały wyniki. Rozdział ten został podzielony na dwa podrozdziały, zgodnie z dwoma modelami badawczymi. Każdy z nich jest zakończony podsumowaniem, które w przejrzysty sposób reasumuje uzyskane dane, co zważywszy na mnogość układów i analiz jest bardzo pomocne w usystematyzowaniu uzyskanych rezultatów. W pierwszym etapie badań Doktorant ocenił poziom 17β -estradiolu i enzymów zaangażowanych w jego metabolizm w surowicy pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz ekspresję receptorów jądrowych i receptora związanego z białkami G w biopsjach jelit takich samych pacjentów. W biopsjach tych ocenił też poziom mRNA dla IL-6 i IL-10. Najciekawsze wyniki można zaobserwować w ekspresji receptorów. Doktorant wykazał istotny wzrost ekspresji receptora estrogenów oddziałującego z białkami G i receptora jądrowego typu α w biopsjach pacjentów cierpiących na obie jednostki chorobowe. Chociaż nie zawsze obserwowano prostą korelację między poziomem białka i mRNA. Taki wynik nie jest niczym zaskakującym zważywszy, na mnogość mechanizmów i etapów jakie mają miejsce w komórce od momentu utworzenia cząsteczki mRNA do powstania

funkcjonalnego białka, co Doktorant w szczegółowy sposób wyjaśnia w rozdziale Dyskusja. Analiza ekspresji receptorów estrogenów z podziałem na płeć i wiek pokazała niezwykle interesujące i cenne dane. Nasilenie ekspresji receptora typu α i receptora estrogenów oddziałującego z białkami G obserwowano w grupie mężczyzn z obydwoma podtypami chorób zapalnymi jelit. U kobiet natomiast zaburzenia w ekspresji receptorów estrogenów nie były tak widoczne i głównie dotyczyły chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Nadekspresję receptora typu α obserwowano u kobiet po 50 roku życia, natomiast u kobiet przed 50 rokiem życia nadekspresji ulegał receptor estrogenów oddziałujący z białkami G. Warto zaznaczyć, że w dostępnym piśmiennictwie dane na temat receptora estrogenów oddziałującego z białkami G w chorobach zapalnych jelit są śladowe. Dlatego uważam, że uzyskane przed Doktoranta dane pokazujące jego nasiloną ekspresję w biopsjach pacjentów są bardzo cennym wkładem w wiedzę dotyczącą tych jednostek chorobowych. Mam natomiast następujące uwagi i pytania do tego podrozdziału.

- Dlaczego wybrano IL-6 i IL-10 i oznaczano je tylko na poziomie mRNA chociaż jak sam Doktorant podkreśla przepływ informacji DNA, RNA, białko nie jest liniowy? Szczególnie interesuje mnie cel oznaczenia immunosupresyjnej IL-10. Lepszym wyborem moim zdaniem była by IL-1 β , IL-17 czy jakieś inne cytokiny, których udział w chorobach zapalnych jelit był omówiony we Wstępie.

- Tabela 8, czy poziom CRP u chorych był statystycznie znamieny? Jeśli tak to brak „gwiazdki”.

W drugiej fazie pracy Doktorant postanowił wyjaśnić rolę receptora estrogenów związanego z białkami G w chorobie Leśniowskiego-Crohna, na modelu mysim. Aby zrealizować to zadanie mgr Jacenik przeprowadził wieloparametryczną ocenę makroskopową, mikroskopową i molekularną jelita grubego myszy z wywołaną chorobą Leśniowskiego-Crohna, którym podawano 17 β -estradiol, 2 związki będące selektywnymi agonistami receptora estrogenów oddziałującego z białkami G, oraz jego antagonistę. W swoich badaniach Doktorant jednoznacznie wykazał, że aktywacja receptora estrogenów związanego z białkami G za pomocą 17 β -estradiolu lub też selektywnych agonistów prowadzi do poprawy architektury jelita, zmniejsza jego owrzodzenie, osłabienia stan zapalny i ograniczenia infiltrację komórek układu odpornościowego. Co istotne, tym pozytywnym efektem towarzyszył spadek ekspresji nie tylko receptora estrogenów oddziałującego z białkami G, ale również receptorów jądrowych, co jak mgr Jacenik słusznie zauważył świadczy o ściślejszej kooperacji między nimi. Istotnym wynikiem uzyskanym przez Doktoranta w tej części badań jest wykazanie, iż aktywacja receptora estrogenów oddziałującego z białkami G obniża

aktywność białek sygnałowych MEK1/2 i ERK1/2, należących do szlaku kinaz MAP, który odgrywa ważną rolę w inicjacji proliferacyjnej i pro-zapalnej aktywności komórki. Kolejne badania przeprowadzone przez Doktoranta pokazały, iż aktywacja badanego receptora estrogenów obniża ekspresję szeregu genów związanych ze stanem zapalnym takich jak *NOS2*, *Stat3*, *RelA*, *Vegfa* i innych, których nadekspresja jest obserwowana w jelicie grubym myszy z indukowaną chorobą Leśniowskiego-Crohna. Należy jednak pamiętać, że obserwowana przez Doktoranta pozytywna zmiana w poziomie transkryptów genów, wywołana aktywacją receptora estrogenów, nie musi się przekładać na efekt końcowy widoczny w aktywności biologicznej komórki. Niezależnie od moich uwag z przekonaniem stwierdzam, że uzyskane wyniki w tej części badań jasno pokazały, że receptor estrogenów związany z białkami G ma istotną rolę w wyciszeniu stanu zapalnego w jelicie, poprawie jego stanu makro i mikroskopowego, co może być w przyszłości punktem wyjścia do szerszych badań dotyczących terapii celowanej.

Dyskusję czyta się z przyjemnością jest ona syntetyczna, ale dojrzałe napisana i świadczy o biegłej znajomości przez Doktoranta zagadnień związanych z sygnalizacją estrogenową. Mgr Jacenik w sposób krytyczny dokonał przejrzystej analizy oraz interpretacji własnych wyników na tle dostępnego piśmiennictwa z ostatnich lat, co nie jest łatwe zważywszy na znikomą liczbę informacji na temat receptora estrogenów oddziałującego z białkami G w chorobach zapalnych jelit. Mam jednak jedną uwagę. Na stronie 78 znalazło się stwierdzenie, że „Stan zapalny potwierdziły również analizy ekspresji *IL-6* i *IL-10*....”. *IL-10* jest interleukiną immunosupresyjną nie pro-zapalną, także nie może potwierdzać stanu zapalnego.

Rozprawę kończą wnioski wynikające z opisanych wyników. Streszczenie w języku polskim i angielskim oddaje charakter pracy i nie budzi zastrzeżeń. Bibliografia liczy 166 pozycji i są to prace w większości z ostatnich 10 lat. Przejrzystość pracy wzbogaca wykaz skrótów.

Ocena końcowa

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska reprezentuje wysoki poziom naukowy i warsztatowy. Stanowi bardzo cenny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych zachodzących w świetle jelita grubego w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. Opisane przez Doktoranta nowatorskie badania jasno sugerują, że aktywacja receptora estrogenów oddziałującego z białkami G jest kluczowa w poprawieniu architektury jelit i zniesienia stanu zapalnego. Uważam, że opisane wyniki badań mają bardzo dużą wartość poznawczą, ale także praktyczną i mogą być pomocne w

poszukiwaniu nowych targetów docelowych w leczeniu nieswoistego zapalenia jelit. Warto także podkreślić duży wkład Doktoranta w pracę eksperymentalną. Ponadto, wyniki opisane w monografii zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie *Scientific Report* o IF=4,122.

Chciałbym również pogratulować Doktorantowi wspaniałego dorobku naukowego. Mgr Jacenik jest współautorem 12 (w tym w 4 jest pierwszym autorem) prac eksperymentalnych o łącznym IF=36,829 i łącznej liczbie punktów MNiSW=342. Jest też współautorem dwóch rozdziałów w książkach. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż był kierownikiem dwóch projektów (Preludium i Etiuda) finansowanych przez NCN, oraz dwóch projektów własnych przyznanych przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Dlatego też z pełnym przekonaniem wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Damiana Jacenika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na to, że praca została wykonana profesjonalnie z wykorzystaniem nowoczesnych metod i technik oraz mając na uwadze znakomity dorobek Doktoranta wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie mgra Jacenika stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej
Instytutu Biologii Medycznej PAN

Prof. dr hab. Magdalena Klink