

Prof. dr hab. Janusz Szemraj  
Zakład, katedra Biochemii Medycznej  
ul. Mazowiecka 6/8  
92-215 Łódź  
tel/fax: 042678-24-65  
e mail: Janusz.szemraj@umed.lodz.pl

Łódź, 02.05.2019r.

### **Recenzja pracy doktorskiej**

„Sygnalizacja estrogenowa w chorobach zapalnych jelit” wykonaną przez mgr Damiana Jacenika w Katedrze Cytobiochemii UŁ w Łodzi w ramach Studiów Doktoranckich Biochemiczno-Biofizycznych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy M. Krajewskiej.

Nieswoiste choroby zapalne jelit to grupa idiopatycznych schorzeń przewodu pokarmowego, takich jak: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna, makroskopowe zapalenie jelita grubego. Charakteryzują się przewlekłym trwającym stanem zapalnym wywołanym niewłaściwą reakcją immunologiczną. Zarówno choroba Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejące zapalenie jelita grubego są ważnym i coraz większym problemem zdrowotnym w krajach rozwiniętych, stanowią grupę przewlekłych, nieuleczalnych schorzeń przewodu pokarmowego o wieloczynnikowej patogenezie. Cechują się samoistnymi remisjami i nawrotami, których etiologia pozostaje niewyjaśniona.

W chorobach zapalnych jelit obserwuje się zaburzenia sygnalizacji estrogenowej m.in. w modulacji fenotypu limfocytów T przez receptory estrogenowe GPER. Estrogeny regulują wzrost, różnicowanie komórek oraz warunkują prawidłowy rozwój układu rozrodczego. Ich biologicznie działanie zależne jest od obecności receptora estrogenowego. W wielu badaniach wykazano immunomodulacyjną rolę estrogenów w patofizjologii licznych chorób. Długo trwający stan zapalny jelit może prowadzić do transformacji nowotworowej. Mgr Damian Jacenik w ramach pracy doktorskiej postanowił odpowiedzieć na zasadnicze pytanie czy za zaburzenia sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit odpowiedzialne są

estrogeny, czy ekspresja receptorów estrogenów odpowiedzialnych za efekt genomowy i niegenomowy działania estrogenów.

Wybór przez Panią Promotor i Doktoranta tej tematyki badań uważam za nowatorski, bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 110 stron zawierającą 30 rycin, 8 tabel i 166 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatniego okresu czasu, które posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 20 stron; zawiera 6 dobrze dobranych rycin. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia budowy, znaczenia receptorów estrogenowych w chorobach jelit.

Część teoretyczną pracy rozpoczyna rozdział w którym Doktorant przedstawił budowę receptorów estrogenowych, ich oddziaływanie z białkami G oraz interakcje pomiędzy nimi. W kolejnych rozdziałach przedstawiona została rola estrogenów, receptorów estrogenów w chorobach zapalnych jelit, nowotworach jelita grubego związanych ze stanem zapalnym. Ostatni rozdział tej części pracy poświęcony jest znaczeniu estrogenów, receptorów estrogenowych w modulacji przepuszczalności, motoryki oraz wrażliwości trzewnej jelit.

Przygotowany przez mgr Dominika Jacenika przegląd piśmiennictwa stanowi oryginalnie przemyślany, wyjątkowo interesujący i świetnie zilustrowany wykład na temat aktualnej wiedzy o omawianych zagadnieniach. Autor dowiódł, że potrafi wykorzystywać dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować i komentować. Przygotowana część teoretyczna nadaje się na bardzo dobry artykuł przeglądowy do którego z całym przekonaniem namawiam.

Część doświadczalna pracy obejmuje 54 strony. Poświęcona jest ocenie udziału sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit w zależności od płci i wieku kobiet, identyfikacja mechanizmów molekularnych indukowanych za pośrednictwem receptorów estrogenów w chorobie Leśniowskiego-Crohna, ocenie potencjalnych oddziaływań pomiędzy receptorami estrogenów w analizowanej jednostce chorobowej. Rozdział „Założenia i cele pracy” wskazuje, iż Autor postanowił, w ramach założonego nurtu badań i w oparciu o

zreferowane wcześniej przesłanki teoretyczne, w praktyce wypełnić cztery szczegółowe cele polegające między innymi na oznaczeniu poziomu  $17\beta$ -estradiolu i wybranych enzymów jego metabolizmu, określenie poziomu ekspresji receptorów estrogenów, tj. GPER, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 46 u mężczyzn oraz kobiet przed i po 50 roku życia z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Kolejne cele związane były z modelem zwierzęcym myszy – dotyczyły oceny wpływu aktywacji/inhibicji receptorów estrogenów, w tym GPER, na obraz makroskopowy i mikroskopowy jelita grubego oraz znaczniki biochemiczne, identyfikacji szlaków sygnałowych modulowanych z udziałem GPER, identyfikacja genów regulowanych z udziałem GPER w chorobie Leśniowskiego-Crohna indukowanej kwasem 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfonowym u myszy.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane bardzo wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Badania przeprowadzono na materiale biologicznym który stanowiły bioptyaty jelita grubego oraz surowica pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2011 – 2017 na które Doktorant uzyskał zgodę Komisji do spraw Bioetyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Druga część badań przeprowadzono z wykorzystaniem samców myszy typu dzikiego szczepu BALB/c w wieku 6 – 8 tygodni pozyskanych ze Zwierzętarń Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego również dysponując zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Przeprowadzone badania oparto o nowoczesne, trudne techniki eksperymentalne min. biologii molekularnej, tj.: analiza ekspresji genów na poziomie mRNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej w czasie rzeczywistym, białka metodą Western blot, czy lokalizacji białek techniką immunofluorescencyjną prawidłowo dobranych do rozwiązywania podjętych zadań. Ich opis stanowi rodzaj swoistego laboratoryjnego „manualu”.

Wszystkie użyte metody charakteryzuje wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne oparte na programie GraphPad Prism 5.0, testie U Manna-Whitney’a-Wilcoxon do porównania grup eksperymentalnych oraz jednoczynnikowa analizę wariancji (One-Way ANOVA) z testem post hoc Newmana-Keulsa nie budzą zastrzeżeń.

Dokumentacja wyników uzyskanych w recenzowanej pracy obejmuje 25 rycin. Przekonuje ona, że wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały z dużą skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań. Sposób ich prezentacji jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań.

Uzyskane wyniki wykonane na materiale biologicznym pochodzących od pacjentów nie wykazały zmian w poziomie  $17\beta$ -estradiolu i wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm estrogenów. Analiza ekspresji receptorów estrogenów, zarówno receptora GPER oraz jądrowych receptorów estrogenów – ER $\alpha$  i ER $\beta$ , a także produktów alternatywnego składania genu kodującego ER $\alpha$  – ER $\alpha$ 36 i ER $\alpha$ 46 wskazała na ich deregulację w komórkach jelita grubego pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu z osobami bez zdiagnozowanej choroby jelit co może wskazywać na zależność ekspresji analizowanych genów od płci, wieku chorych.

Druga część badań w ramach pracy doktorskiej przeprowadzona została na modelu zwierzęcym indukowanej choroby Leśniowskiego-Crohna. Podanie selektywnych agonistów GPER: związku G-1, czy Fulvestrant który jest jednocześnie antagonistą jądrowych receptorów estrogenowych wpłynęło na wskaźnik przeżycia myszy z indukowaną chorobą, obserwując ograniczenie stanu zapalnego na poziomie makro, mikroskopowym co korelowało ze spadkiem aktywności mieloperoksydazy i poziomu białka C-reaktywnego. Udział receptora GPER – jego zwiększoną ekspresję, obniżoną po podaniu agonistów w chorobie Leśniowskiego-Crohna wykazano zarówno u samców myszy z chorobą LC jak również bioptatach jelit chorych z chorobą LC. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują na wpływ aktywności GPER na ekspresję genów biorących udział w reakcji immunologicznej: Ccnd1, Kras, Stat3, Rela, Nos2, Ptgs2, Vegfa i Trpv4 Ccnd1, Kras, Stat3, Rela, Nos2, Ptgs2, Vegfa, Trpv4, szlaku sygnałowego ERK

W części Dyskusja liczącej 10 stron Doktorant przedyskutował uzyskane wyniki z danymi literaturowymi dotyczącymi dotychczasowych badań na temat potencjalnego udziału sygnalizacji estrogenowej w chorobach zapalnych jelit i immunomodulacyjnych właściwościach estrogenów. W dalszej kolejności omówił jednocześnie porównując doniesieniami literaturowymi ekspresję genów receptorów ER $\alpha$ ,  $\beta$ , ich deregulację w chorobach zapalnych jelit w tym rolę w wielu procesach związanych z regulacją proliferacji komórek czy też modulacją odpowiedzi immunologicznej. Doktorant przedstawił i

przedyskutował udział alternatywnego składania genu kodującego  $E\alpha\beta$  w patofizjologii stanu zapalnego jelita. W dalszej części dyskusji w oparciu o dane otrzymane na modelu CD indukowanego u samców myszy TNBS przedstawił rolę aktywacji/inhibicji GPER w regulacji stanu zapalnego w chorobie Leśniowskiego-Crohna.

Jako Recenzent chciałbym Doktorantowi zadać kilka pytań: jakie jest fizjologiczne znaczenia receptora GPER, jego potencjalnego znaczenie w nowotworach jelita grubego związanych ze stanem zapalnym. W przeprowadzonych w pracy badaniach Doktorant wykazał, że podanie zarówno G-1, jak i ICI 182,780 obniżało śmiertelności myszy z CD podczas gdy  $17\beta$ -estradiol nie wpływał na poprawę wskaźnika przeżycia w mysim modelu CD. Prośba do Doktoranta o możliwą interpretację tego wyniku.

Przeprowadzone przez mgr Damiana Jacenika badania wykazały wpływ sygnalizacji estrogenowej w tym receptora GPER na stan kliniczny, przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna po przez zmiany w komórkach nabłonka jelita grubego. Obserwowana deregulacja sygnalizacji estrogenowej zależny od płci i wieku kobiet co może wpływać na zmiany stanu zapalnego nabłonka jelit.. Na podstawie uzyskanych wyników mgr Damian Jacenik sformułował 3 końcowe wnioski, uogólniające zreferowane i przedyskutowane dane. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktoranta celów jego dysertacji.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Damiana Jacenika pod każdym względem spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo informacje na temat receptora GPER, możliwości jego wykorzystania jako celu terapeutycznego. Przygotowana została w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Kilka drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia. Na szczególne podkreślenie należy finansowanie przedstawionej do recenzowania pracy. Przeprowadzone w ramach doktoratu badania były finansowane ze środków dwóch przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki projektów: Preludium 2016 – 2019, Etiuda 5, 2017 – 2018, dwóch projektów przyznanych w ramach dotacji na działalność polegającą na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na projekty. W przedstawionych projektach Pan mgr Damian Jacenik był kierownikiem. Efektem aktywności naukowej Doktoranta jest 12 prac

oryginalnych, przeglądowych o IF = 36, 829, 342 punktach MNiSW, 2 rozdziały w książkach, 25 doniesień konferencyjnych.

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska mgr Damiana Jacenika zatytułowana „Sygnalizacja estrogenowa w chorobach zapalnych jelit” ” odpowiada warunkom określonym w art. 11 ustawy o tytułach i stopniach naukowych (Dz. Ust. Nr 65 /90,póz. 386) dla rozprawy na stopień doktora, ze względu na bardzo duży walor aplikacyjny, oraz nowatorski zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr inż. Damiana Jacenika do dalszych etapów przewodu doktorskiego jednocześnie wnioskując o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Rektorską.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Zakład Biochemii Medycznej

92-215 Łódź, ul Mazowiecka 6/8

tel. (042) 272 5677

e-mail: janusz.szemraj@umed.lodz.pl