



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 14 września 2021 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak
Kierownik Samodzielnego Laboratorium
Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mirona Tokarskiego

Temat rozprawy: Identyfikacja cząsteczek regulujących szlak sygnałowy HGF – c-Met w komórkach śródbłonna stymulowanych hipoksją

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Mirona Tokarskiego została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tadeusza Dobosza w Zakładzie Techniki Molekularnych na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy jest Pani dr inż. Dagmara Baczyńska.

Praca stanowi istotny wkład w badaniach nad biologią komórek śródbłonna naczyń, których aktywność biologiczna związana jest zarówno z regeneracją tkanek jak i wzrostem nowotworów. Jest to obszernie 157-stronicowe opracowanie napisane w języku polskim, bogato ilustrowane zawierające 22 ryciny, 11 wykresów oraz 43 tabele ułatwiających analizę uzyskanych wyników. Rozprawa posiada układ typowy dla prac doktorskich tj. Streszczenie w języku polskim, wprowadzający w temat rozprawy Wstęp, jasno sformułowane Cele pracy, opisy stosowanych Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, Wnioski. Nie ma streszczenia w języku angielskim. Bogate piśmiennictwo liczy 244 pozycje. Rozprawę kończy spis rycin, wykresów i tabel.

Tematem wiodącym rozprawy było zbadanie wpływu hipoksji na regulację szlaku sygnałowego na osi aktywności czynnika wzrostu hepatocytów (HGFA) – HGF – c-Met (receptor HGF) w procesie angiogenezy w modelu ludzkich komórek progenitorowych śródbłonna naczyń (HEPC-CB.1 i HEPC-CB.2) pozyskanych z krwi pępowinowej oraz ludzkich komórek dojrzałego śródbłonna pozyskanych z naczyń krwionośnych skóry (HskMEC). Istotnym etapem badań były badania przesiewowe w celu identyfikacji specyficznych mikroRNA mających wpływ na regulację epigenetyczną szlaku sygnałowego HGFA – HGF– c-Met w procesie angiogenezy.

Część doświadczalną rozprawy poprzedza obszerny **Wstęp** literaturowy, wprowadzający czytelnika w zagadnienia dotyczące założeń badawczych. Doktorant w sposób szczegółowy przedstawił mechanizmy powstawania naczyń krwionośnych i związane z nimi czynniki, które regulują angiogenezę. Szczególną uwagę Autor poświęcił czynnikom troficznym i ich aktywatorom, których interakcje wywołują kaskadę zdarzeń promujących angiogenezę. Należą do nich m.in. czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów – FGF, angiopoetyna 1 i 2, czynnik wzrostu hepatocytów – HGF i jego aktywator HGFA oraz czynniki genetyczne regulujące angiogenezę.

Wstęp jest bardzo obszerny i zawiera istotne informacje dotyczące założeń badawczych pracy, jednakże jego organizacja wymaga dopracowania. Czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego



- VEGF - jest najsilniejszym i najbardziej selektywnym czynnikiem wzrostu komórek śródbłonna naczyń i ten termin został przedstawiony we Wstępie pracy na stronie 9. W tym miejscu należałoby wyjaśnić, że VEGF stanowi rodzinę, do której należą VEGF-A, -B, -C, -D, PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu), i VEGF-E (wirusowy homolog). Cytokiny te należą do tej samej rodziny jednakże są produktami różnych genów, mają odmienną strukturę i działanie biologiczne a VEGF-A jest najlepiej poznanym przedstawicielem rodziny VEGF, jakkolwiek część tych informacji pojawiła się w dalszej części Wstępu na str. 18. Uwaga ta podyktowana jest wcześniejszym fragmentem Wstępu w brzmieniu „Różnicowanie komórek śródbłonna w komórki szczytowe lub łodygi, jak wspomniano powyżej zależy od szlaków VEGFA i Notch. W odpowiedzi na VEGFA, w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczki DLL4, rozpoczynają one tworzenie filopodiów i zaczynają migrować wzdłuż gradientu VEGFA” (str. 11). We Wstępie „powyżej” nie ma wzmianki o szlakach VEGFA i Notch i żaden z tych czynników nie został uwzględniony w Tabeli 1 „Charakterystyka najważniejszych cytokin proangiogennych”. W tym fragmencie zarówno termin „VEGFA” jak i „Notch” pojawiają się po raz pierwszy bez wyjaśnienia ich roli w procesie angiogenezy. Pojawia się również skrót DLL4, bez wyjaśnienia jego roli w procesie angiogenezy. Jest wiadomym, że aktywacja szlaku Notch jest istotna w hamowaniu procesów różnicowania komórek macierzystych w celu zachowania ich zdolności do samoodnowy. Ligandem dla receptora Notch jest DLL4 (*Delta-like 4 ligand*), który odgrywa istotną rolę w procesie pączkowania (kiełkowania) naczyń. W procesie angiogenezy receptory Notch wpływają na zahamowanie podziałów komórek szczytowych (czołowych) natomiast VEGF pobudza dzielenie się komórek przemieszczających się za nimi, tym samym Notch i VEGF kontrolują interakcje pomiędzy komórkami szczytowymi śródbłonna a komórkami powstającego odgałęzienia naczyniowego.

W tym miejscu muszę odnieść się do dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego niektórych terminów kluczowych w procesie angiogenezy, których Doktorant konsekwentnie używa w swojej dysertacji, jednakże nie mających odpowiedniego przełożenia na język polski. Można zaakceptować określenie "komórki szczytowe" dla „tip cells”, chociaż niektórzy autorzy używają określenia „komórki czołowe”, jednak użycie terminu „komórki łodygi” dla określenia „stalk cells” jest językowo niezręczne i raczej proponowałabym termin „komórki odnogi” czy „komórki tworzące odgałęzienie” gdyż w procesie angiogenezy powstaje nowe naczynie będące odnogą (odgałęzieniem) istniejącego naczynia krwionośnego. Określenie anglojęzyczne „sprouting” w procesie angiogenezy oznacza powstawanie nowych kapilar z istniejących naczyń, Doktorant używa terminu „kiełkowanie”, jednakże w literaturze polskojęzycznej jest także stosowane określenie „pączkowanie”, które w bardziej odpowiedni sposób odzwierciedla zachodzące procesy.

Niestety, następny fragment Wstępu ze str. 11 stanowi dosłowne tłumaczenie anglojęzycznego tekstu i w języku polskim brzmi niefortunnie cyt. „EC, które wyrażają wyższy poziom DLL4, niską ekspresję Notch w porównaniu z sąsiadującymi komórkami, stają się komórkami szczytowymi i aktywują sygnalizację Notch swoich sąsiadów poprzez interakcje DLL4 – Notch1. Sygnalizacja Notch tłumy następnie fenotypy komórek szczytowych w sąsiadujących EC i stają się komórkami łodygi”. Należy odpowiednio przeredagować cytowany fragment.



Niewątpliwie bardzo ważną częścią Wstępu pracy są dobrze opisane dotychczas poznane mechanizmy epigenetyczne, które kontrolują ekspresję genów w komórkach i mają wpływ na przebieg angiogenezy.

Należy podkreślić, że bogato ilustrowany, opisany na 32 stronach Wstęp zawiera zasób informacji całkowicie wystarczający do dalszej analizy uzyskanych wyników pracy, ich interpretacji i następowych wniosków.

Cele pracy zostały jasno sformułowane i wynikają z przedstawionych we Wstępie zagadnień dotyczących interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi w regulacji procesu angiogenezy. Zbadano wpływ hipoksji na regulację szlaku sygnałowego HGFA – HGF – c-Met w dojrzałych i progenitorowych komórkach śródbłonna naczyń. Niewielka niedoskonałość pojawiła się w pierwszym celu szczegółowym w brzmieniu: „Określenie wpływu hipoksji na ekspresję cząsteczek HGFA, HGF oraz c-Met na modelu ludzkich komórek progenitorowych śródbłonna (HEPC-CB.1 i HEPC-CB.2) oraz ludzkich komórek śródbłonna naczyń krwionośnych (HskMEC)”. W tym ostatnim modelu komórkowym powinno zostać doprecyzowane „...oraz ludzkich komórek dojrzałego śródbłonna naczyń krwionośnych (HskMEC)”.

Rozdział **Material i Metody** zawiera szczegółowe informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia przedstawionych w pracy doświadczeń. Lista opisanych procedur i badań jest długa i szczegółowa, i wraz z przedstawionymi wynikami nie pozostawia wątpliwości, że Doktorant znakomicie opanował warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do oceny wyników badań stanowiących cel niniejszej rozprawy doktorskiej.

W opisie modelu badawczego podano charakterystykę fenotypu komórek użytych do badań w niniejszej dysertacji doktorskiej na podstawie opublikowanych wyników badań. Jednakże we wprowadzeniu do opisu modelu badawczego znalazły się pewne nieścisłości np. W zdaniu „Jako model badawczy zostały użyte dojrzałe ludzkie komórki śródbłonna HSKMEC (ang. *Human Skin Microvascular Endothelial cells*) oraz progenitorowe komórki śródbłonna HEPC-CB.1, HEPC-CB.2 (ang. *Human endothelial progenitor cell lines originated from cord blood*)” wyrażenie „progenitorowe komórki śródbłonna” powinno zostać rozszerzone o źródło ich pochodzenia, tj. „progenitorowe komórki śródbłonna pozyskane (lub izolowane) z krwi pępowinowej”.

Należy podkreślić, że do realizacji założonych celów pracy zastosowano wysokospecjalistyczne techniki w tym: reakcję łańcuchową polimerazy z pomiarem przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) w celu zbadania poziomu zmian ekspresji genów, oraz technologię *Real-Time PCR dla mikroRNA* z wykorzystaniem kart mikroprzepływowych zaprojektowanych do wykonywania 384 jednoczesnych reakcji PCR w czasie rzeczywistym (TaqManR Array Micro Fluidic Cards).

W pracy jest wiele skrótów czy wyrażen potocznych stosowanych w pracy codziennej laboratorium, jednakże w opracowaniu naukowym jakim jest rozprawa doktorska należy zachować większą staranność w opisie procedur i wyników.

Przykłady: Str. 47 ;..... komórki zostały poddane stymulacji hipoksją wywołaną przez przebywanie w medium zawierającym chlorek kobaltu...” bardziej zręczne byłoby wyrażenie „...wywołaną przez umieszczenie w medium...”.

Str. 47 „Następnie wykonane zostały badania określające zmiany poziomu mRNA oraz białka dla genów *HGF*, *HGFA*, *c-Met*, *HIF-1α* oraz *VEGF* w czasie.” Zdanie wydaje się



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

niedokończone, należy doprecyzować w jakim czasie (np. wielogodzinnej ???, wielodniowej ???, obserwacji).

Str. 56 „...w formie współczynników ilościowych RQ, wyradzających krotkość zmian ekspresji” powinno być „.....wyrażających krotkość zmian ekspresji”.

„Przyrost ilości zarówno komórek.....” (str. 78) powinno być „przyrost liczby komórek...”.

Metody statystyczne zastosowane do opracowania uzyskanych wyników są adekwatne i zostały szczegółowo przedstawione w rozdziale „Analiza wyników”.

Wyniki. Starannie opracowane wyniki pracy przedstawiono w sposób przejrzysty i czytelny co zostało udokumentowane 12 rycinami, 11 wykresami i 24 tabelami oraz ich podsumowaniem po każdym etapie badań. Wyniki są opisane wyczerpująco i zostały poparte wnikliwą analizą statystyczną z zastosowaniem odpowiednich metod statystycznych. Jednakże, do opisów niektórych wyników wkradły się pewne nieścisłości.

Przy ocenie wpływu chlorku kobaltu (CoCl_2) na proliferację komórek Doktorant stwierdza, że uzyskane wyniki wskazują na większą wrażliwość komórek HSKMEC na cytotoksyczne działanie chlorku kobaltu przy zbliżonym profilu proliferacyjnym komórek HEPC-CB.1 oraz HEPC-CB.2. Oczywiście chlorek kobaltu hamuje wzrost badanych komórek jednakże z przedstawionych wykresów i danych zwartych w tabelach (Tabele 19-21) nie wynika aby komórki HEPC-CB.1 oraz HEPC-CB.2 miały podobny indeks proliferacyjny o czym świadczą wartości absorbancji. Przeciwnie, najwyższy wskaźnik proliferacji mają komórki dojrzałego śródbłonka naczyń HSKMEK, zatem stwierdzenie, że „uzyskane wyniki wskazują na większą wrażliwość komórek HSKMEC na cytotoksyczne działanie chlorku kobaltu” jest nadinterpretacją. Ocena wpływu chlorku kobaltu (CoCl_2) na proliferację komórek byłaby pełniejsza gdyby zostało wykonane porównanie wszystkich badanych linii komórkowych na wykresie kolumnowym zwłaszcza, że wartości absorbancji różnią się pomiędzy komórkami progenitorowymi HEPC-CB.1, HEPC-CB.2 a komórkami dojrzałego śródbłonka naczyń HSKMEC.

W podsumowaniu oceny wpływu chlorku kobaltu (CoCl_2) na proliferację komórek w czasie 72-godzinnej obserwacji, Doktorant stwierdza, że „stężenie chlorku kobaltu w pełnym medium hodowlanym przekraczające $150 \mu\text{M}$ działa hamująco na potencjał proliferacyjny progenitorowych i dojrzałych komórek śródbłonka” jednak nie precyzuje jakiego czasu obserwacji dotyczy podsumowanie. Biorąc pod uwagę założenie, że dalsze badania będą prowadzone w czasie nie przekraczającym 24 godzin, przypuszczam, że podsumowanie dotyczy 24-godzinnej hodowli, ponieważ w większości obserwacji prowadzonych po tym czasie cytotoksyczność CoCl_2 była wyraźnie zaznaczona. Zauważyłam jednak pewne odstępstwo w cytotoksyczności CoCl_2 przy stężeniu $150 \mu\text{M}$ dla linii HEPC-CB.1 po 24-godzinnej obserwacji, gdzie wartość absorbancji względem kontroli wynosiła 0,228 vs 0,288 ($p < 0,03$), co oznacza, że dla tej linii CoCl_2 o stężeniu $150 \mu\text{M}$ ma działanie cytotoksyczne. Zatem w jaki sposób Doktorant wyjaśni wybór $150 \mu\text{M}$ stężenia CoCl_2 dla indukcji hipoksji w linii HEPC-CB.1 do przeprowadzenia kolejnych badań?

Dobór optymalnego stężenia CoCl_2 do badań aktywacji ekspresji genów *HIF-1 α* i *VEGF*, będących odzwierciedleniem procesów indukowanych hipoksją, został przeprowadzony na linii komórek progenitorowych śródbłonka naczyń HEPC-CB.2. Zaobserwowano wzrost



ekspresji genu *VEGF* na poziomie mRNA, który korelował ze wzrostem stężenia CoCl_2 w medium hodowlanym, natomiast w odniesieniu do ekspresji genu *HIF-1 α* zaobserwowano działanie stabilizujące CoCl_2 . Dlaczego podobna procedura doboru optymalnego stężenia CoCl_2 do badań aktywacji ekspresji genów *HIF-1 α* i *VEGF* nie została przeprowadzona dla linii HEPC-CB.1 i HSKMEC?

Kolejnym etapem było badanie wpływu ekspresji genów *HIF-1 α* i *VEGF* na poziomie mRNA dla genów biorących udział w przekazywaniu sygnału w ramach szlaku sygnałowego *HGFA* – *HGF* – *c-Met* w warunkach hipoksji indukowanej CoCl_2 . Analiza wieloczynnikowa PCA (ang. *principal component analysis*) zmian ekspresji badanych genów na poziomie mRNA przeprowadzona dla komórek HEPC-CB.1 wykazała istotne statystycznie powiązania pomiędzy badanymi parametrami wskazując na dodatnią korelację pomiędzy ekspresją genów *VEGF* oraz *c-Met* oraz ujemną korelację z ekspresją *HGF*.

W przypadku linii HEPC-CB.2 wyniki wieloczynnikowej analizy PCA wskazują na dodatnio skorelowany związek zmian ekspresji genów *VEGF*, *HGF* oraz *c-Met* oraz ujemną korelację w przypadku ekspresji genu *HIF-1 α* na poziomie mRNA. Biorąc pod uwagę, że linie HEPC-CB.1 i HEPC-CB.2 zostały wyprowadzone z komórek krwi pępowinowej pochodzącej od tej samej pacjentki proszę o interpretację w jaki sposób można wyjaśnić rozbieżność w korelacji ekspresji *HGF* pomiędzy uzyskanymi wynikami dla tych dwóch linii komórkowych?

Wyniki analizy dla linii dojrzałych komórek śródbłonna naczyń HSKMEC wskazują na istotne statystycznie powiązania pomiędzy badanymi parametrami wskazując na ujemną korelację ekspresji genów *VEGF* oraz *HIF-1 α* , jak również genu *c-Met* oraz na wzajemny związek zmian ich ekspresji.

Analiza *c-Met* oraz markera stanu niedotlenienia *HIF-1 α* na poziomie białka metodą Western-Blot nie powiodła się o czym Doktorant rzetelnie poinformował w swojej pracy. Sugeruję, że w tej sytuacji pomocną techniką byłoby podwójne barwienie immunocytochemiczne lub immunofluorescencyjne identyfikujące jądrową ekspresję *HIF-1 α* i błonową *c-Met*.

Poziom białka, będącego odzwierciedleniem ekspresji genów dla *VEGF* i *HIF-1 α* został zbadany metodą ELISA. Stały wzrost ekspresji *VEGF* obserwowano w liniach komórek progenitorowych śródbłonna naczyń, natomiast w linii komórek dojrzałego śródbłonna naczyń zaobserwowano spadek ekspresji *VEGF* na poziomie białka w 24 godzinie obserwacji. W tej analizie Wykres 11 „Charakterystyka zmian ekspresji genu *VEGF* w czasie w komórkach HEPC-CB.1, HEPC-CB.2 oraz HSKMEC poddawanych i niepoddawanych działaniu chlorku kobaltu (II)” został nieprawidłowo opisany. Jest to analiza zmian poziomu białka *VEGF* a nie ekspresji genu *VEGF*.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu niedotlenienia na zmiany w regulacji epigenetycznej genów szlaku sygnałowego *HGFA* – *HGF* – *c-Met* oraz genów cytokin proangiogennych *HIF-1 α* i *VEGFA* na poziomie mikroRNA przy użyciu techniki Real-Time PCR z wykorzystaniem kart mikroprzepływowych TaqMan®Array. Analiza bioinformatyczna wykazała zmianę ekspresji mikroRNA pod wpływem hipoksji indukowanej chemicznie w komórkach HEPC-CB.1; HEPC-CB.2 oraz HSKMEC, przy czym wzrost lub spadek ekspresji analizowanych mRNA różnił się pomiędzy badanymi komórkami w czasie 24-godzinnej obserwacji. Dalsza analiza wykazała, że zmiany profilu transkrypcyjnego niektórych cząsteczek mikroRNA są także powiązane ze spadkiem lub wzrostem ekspresji docelowego genu.



Dyskusja. W obszernej i rzeczowej dyskusji Doktorant w sposób krytyczny dokonał przejrzystej analizy i interpretacji uzyskanych wyników na tle bogatego piśmiennictwa, liczącego 244 pozycji. Analiza uzyskanych wyników badań została przeprowadzona w sposób dojrzały a na uwagę zasługuje świadomość niedoskonałości interpretacji niektórych wyników i podanie sposobu rozwiązania problemu poprzez wskazanie testów, które powinny zostać wykonane aby potwierdzić ich wartość naukową.

W Dyskusji również znalazły się niedoskonałości stylistyczne w wyrażeniach: „.....testy w celu określenia zmian w czasie poziomu mRNA....” - lepiej brzmiałoby „.....testy w celu określenia zmian poziomu mRNA w czasie 24-godzinnej obserwacji”, czy wyrażenie „.....cząsteczek szlaku analizowanego sygnałowego.....” powinno być „.....cząsteczek analizowanego szlaku sygnałowego.....” (str. 124).

Wnioski wynikające z podsumowanych wyników stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

Uchybienia redakcyjne w niniejszej dysertacji, które zostały wymienione przy omawianiu kolejnych części pracy, w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy a stanowią jedynie wskazówki dla Doktoranta przed przygotowaniem pracy do druku w specjalistycznym czasopiśmie.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Mirona Tokarskiego stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe, które niewątpliwie przyczynia się do poznania regulacji ekspresji aktywatora HGF (HGFA) oraz identyfikacji cząsteczek mikroRNA zaangażowanych w mechanizmy regulacji epigenetycznej szlaku sygnałowego HGF/c-Met w warunkach hipoksji indukowanej chemicznie. Przedstawione zarówno w Wynikach jak i w Dyskusji analizy uzyskanych wyników dają podstawy do stwierdzenia, że Doktorant nie tylko potrafi zaplanować badania eksperymentalne ale przede wszystkim właściwie zinterpretować uzyskane wyniki. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwoju badań prowadzących do poszerzenia dotychczasowej wiedzy dotyczącej biologii progenitorowych i dojrzałych komórek śródbłonna naczyń oraz mogą służyć do badań nad opracowaniem nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób niedokrwienych czy zwalczaniu nowotworów.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji 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 późniejszymi zmianami), stawiane rozprawom na stopień doktora, wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Mirona Tokarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak