



**dr hab. Katarzyna Dzitko, prof. UŁ**  
Katedra Mikrobiologii Molekularnej UŁ  
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź  
tel. (42) 635 44 46  
e-mail: [katarzyna.dzitko@biol.uni.lodz.pl](mailto:katarzyna.dzitko@biol.uni.lodz.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej zatytułowanej:**  
***„Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych i trudno poddających się leczeniu”***

**Przesłanki formalno-prawne przygotowania oceny pracy doktorskiej**

Podstawą wykonania oceny pracy doktorskiej lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej zatytułowanej: *„Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych i trudno poddających się leczeniu”* było pismo Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pani prof. dr hab. n. med. Moniki Łukomskiej-Szymańskiej z dnia 26 stycznia 2022 r., informujące o powołaniu mnie na recenzenta ww. pracy zgodnie z decyzją Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca została wykonana pod kierunkiem Promotora Pana prof. dr. hab. n. med. Przemysława Lewkowicza z Zakładu Immunogenetyki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

**Źródło finansowania pracy doktorskiej oraz współpraca**

Badania w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej prowadzone były w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS 2015/17/B/NZ6/04251 zatytułowanego: *„Poszukiwanie genów związanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych trudno poddających się leczeniu”* pod kierownictwem prof. dr. hab. n. med. Przemysława Lewkowicza oraz w ramach współpracy z Kliniką Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Kliniką Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Kliniką Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pracownią Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Katedrą Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz Genomed S.A. w Warszawie.

**Ocena rozprawy**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje niezwykle istotną tematykę badawczą, ciągle wymagającą uzupełnienia, a dotyczącą wyjaśnienia kluczowych

mechanizmów na poziomie molekularnym związanych ze zmianą polaryzacji ludzkich neutrofilii, wykazujących zdolność nie tylko do eliminacji patogenów, ale także inicjacji procesu regeneracji tkanek, co w konsekwencji może prowadzić do angiogenezy i remodelingu tkanki po zapaleniu.

Układ przedstawianej do recenzji pracy doktorskiej jest typowy. Składa się na nią trzynaście rozdziałów: „Dorobek naukowy”, „Wykaz skrótów”, „Wstęp”, „Założenia i cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Podsumowanie”, „Streszczenie”, „Abstrakt”, „Wyniki tabele” oraz „Piśmiennictwo”. W liczącym piętnaście stron „Wstępie” Doktorantka przedstawia na poziomie podstawowym charakterystykę granulocytów obojętnochłonnych stanowiących ważny element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, dokonując przeglądu literatury na temat ich roli w naturalnym procesie neutralizacji patogenów spotęgowanym przez tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych oraz patologicznej roli neutrofilii w przewlekłych stanach zapalnych. W dalszej części zwięźle charakteryzuje: (i) mechanizmy prowadzące do neutralizacji patogenów zwracając uwagę na rolę receptorów TLR, czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B jako kluczowego czynnika związanego z aktywacją neutrofilii, (ii) apoptozę jako fizjologiczny proces prowadzący do wyciszenia zapalenia, (iii) modyfikację epigenetyczną histonów w procesie acetylacji i metylacji związanej z polaryzacją leukocytów. Doktorantka w ostatniej części „Wstępu” jedynie wymienia mediatory reakcji zapalnej odgrywające ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu oraz w wielu procesach chorobowych. Ponadto, opisując rodzaje zapalenia na przykładach trzech wybranych jednostek chorobowych, dobrze uzasadnia podjęte badania, których „Założenia i cele” formułuje sprawnie i rzeczowo. Do tej części pracy nie mam pytań, a jedynie uwagę dotyczącą niepodjęcia wysiłku stworzenia własnego schematu, ryciny lub tabeli, które zdecydowanie podniosłyby walory pracy oraz świadczyły o dogłębnym przeanalizowaniu mechanizmów zaangażowanych w proces aktywacji i polaryzacji neutrofilii.

Obszerną część poświęconą doświadczeniom przeprowadzonym na potrzeby pracy doktorskiej rozpoczyna rozdział „Materiały i metody”, który jest napisany czytelnie i zwięźle. Doktorantka przedstawia dwa zaplanowane modele do badań *in vitro*: oparte na neutrofilach izolowanych od osób zdrowych, a następnie poddanych stymulacji IL-10, ultraczystym LPS, a także preaktywacji TNF- $\alpha$  oraz na komórkach pobranych od pacjentów obrazujących trzy odmienne stany aktywacji neutrofilii: (i) z zespołem uogólnionej reakcji zapalnej, (ii) ze zdiagnozowanym zapaleniem rdzenia kręgowego oraz nerwów wzrokowych (NMOSD – *neuromyelitis optica spectrum disorders*) oraz (iii) z uogólnionym zapaleniem przyzębia w III i IV stadium zaawansowania choroby. Doktorantka zakwalifikowała do badań pacjentów biorąc pod uwagę właściwe kryteria i wykluczenia, zgodnie z międzynarodowymi standardami oraz po uzyskaniu koniecznej do tych badań zgody Komisji Biomedycznej UM w Łodzi. Wybór modelu badawczego i przeprowadzona walidacja otrzymanych wyników z użyciem neutrofilii poddanych stymulacji różnymi bodźcami, odzwierciedlającymi naturalne procesy ich aktywacji, jakie zachodzą w organizmie osób z odpowiednimi jednostkami chorobowymi w stosunku do komórek wyizolowanych od zakwalifikowanych pacjentów, jak i zdrowych dawców, zasługuje wg mojej opinii na szczególne wyróżnienie. Znakomite opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę potwierdzone jest także przez szeroką gamę

zastosowanych metod badawczych, od standardowych wykonanych za pomocą testów komercyjnych (m.in. izolacja neutrofilii, ocena produkcji reaktywnych form tlenu, ocena zdolności komórek do fagocytozy, analiza cząsteczek adhezyjnych CD11b/CD18, czy oznaczenie stężeń cytokin i chemokin) do nowoczesnych metod badawczych z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i analiz bioinformatycznych (m.in. badanie interakcji białka z DNA – ChIP-sequencing, analiza ekspresji genów). Całość uzupełnia opis stosowanych metod statystycznych. Ten rozdział rozprawy doktorskiej oceniam bardzo dobrze, ale z racji powierzonej mi funkcji, pragnę dodać, iż moje zastrzeżenie budzą niektóre nazwy nadane podrozdziałom. Nie jest uprawnione stosowanie określenia „*Model in vivo*” dla badań przeprowadzonych poza organizmem, od którego jedynie wyizolowano komórki, a następnie badano różne parametry ich aktywności lub izolowano z nich materiał genetyczny. Nie jest w pełni trafne użycie nazw jednostek chorobowych: „*Sepsa*”, „*NMOSD*” czy „*Choroba przyzębia*” do nadawania tytułów podrozdziałów pracy doktorskiej dotyczących opisu kryteriów rekrutacji pacjentów. Proponowałabym np. zamiast tytułu „*Sepsa*” tytuł „*Kryteria rekrutacji pacjentów z zespołem reakcji zapalnej*”. Podobna uwaga tyczy się podrozdziałów o nazwie „*Wybuch tlenowy neutrofilii*” i „*Fagocytoza*” (odnoszących się do konkretnych procesów biologicznych), które proponowałabym nazwać odpowiednio „*Ocena produkcji reaktywnych form tlenu*” i „*Ocena zdolności neutrofilii do fagocytozy*”. Zastosowanie użytych w nazwach podrozdziałów skrótów myślowych nie jest precyzyjne i może wprowadzić czytelników w błąd.

Uzyskane „*Wyniki badań*”, zebrane na 12 rycinach, zostały przedstawione w sposób uporządkowany i bardzo dobrze dokumentujący realizację założeń pracy. Warta podkreślenia jest skrupulatnie przygotowana (oprócz wspomnianego opisu) analiza statystyczna otrzymanych rezultatów badań. Doktorantka posługując się szerokim warształem metodycznym w pierwszym etapie badań przeprowadza cykl eksperymentów na neutrofilach, pozyskanych od osób zdrowych, stymulowanych *in vitro* czynnikami zewnętrznymi imitującymi różne fazy zapalenia, wskazując grupy genów swoistych i związanych z polaryzacją neutrofilii w kierunku komórek supresorowych, a także grupy genów związanych z aktywacją w komórce szlaku NF- $\kappa$ B oraz inicjacji procesu apoptozy. Otrzymane wyniki wydają się bardzo ciekawe i pokazują, że profil wydzielanych cytokin/chemokin i czynników wzrostu (m. in. VEGF) przez stymulowane lub preaktywowane różnymi czynnikami neutrofile oraz rodzaj rekrutowanych komórek wskazujący na inicjowanie regeneracji tkanki po zapaleniu związany jest z pozycjonowaniem genów poprzez modyfikacje kluczowego dla aktywności przeciwniekcyjnej neutrofilii histonu H3K4me3 i uruchamianiem alternatywnej drogi aktywacji szlaku NF- $\kappa$ B. Na słuszność hipotezy o alternatywnej aktywacji szlaku NF- $\kappa$ B w przypadku preaktywacji neutrofilii TNF- $\alpha$  wskazuje przewaga procesów acetylacji (nad metylacją) histonu H3 i wzmożona synteza inhibitora I $\kappa$ B. Otrzymane wyniki stanowią bardzo wysoką wartość poznawczą przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, a jednocześnie jak wskazuje Doktorantka są „*celem nadrzędnym ...*” pracy doktorskiej realizowanej w ramach projektu NCN. Poddanie weryfikacji otrzymanych wyników w modelu *in vitro* w odniesieniu do komórek pobranych od pacjentów z adekwatnymi jednostkami chorobowymi, odzwierciedlających proces: (i) stymulacji neutrofilii LPS(em) – pacjenci z sepsą wywołaną

bakteriami *E. coli*, (ii) preaktywacji neutrofilii TNF- $\alpha$  – pacjenci cierpiący na neurologiczną chorobę autoimmunizacyjną, (iii) stymulacji neutrofilii IL-10 – osoby z chorobą przyzębia w okresie remisji objawów chorobowych, było rozwiązaniem nie tylko bardzo przemyślnym, ale ponadto opartym na danych literaturowych. Należy podkreślić, że o prawidłowym doborze przypadków klinicznych świadczyła też silna korelacja pomiędzy dwoma zastosowanymi modelami badawczymi a profilem cytokin/chemokin i czynników wzrostu, a także profilem ekspresji genów związanych z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B, podjednostką RelA NF- $\kappa$ B oraz białkiem histonowym H3K4me3. Podjęte badania umożliwiły także pozyskanie nowej wiedzy na temat identyfikacji regionów odpowiedzialnych za wiązanie histonu H3K4me3 do DNA związanych z aktywacją neutrofilii oraz odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek immunosupresorach o właściwościach wyciszających zapalenie oraz inicjujących regenerację tkanki, które mogą być wykorzystane do wysoce swoistej celowanej terapii genowej.

Podsumowując, Doktorantka swoje badania przeprowadziła na dwóch modelach, stawiając wiele interesujących hipotez, które następnie z powodzeniem zweryfikowała. Liczba i jakość zaplanowanych i przeprowadzonych badań w pracy świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę w stopniu bardzo dobrym warsztatu pracy doświadczalnej oraz umiejętności wnioskowania i samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w oparciu o zdobytą wiedzę teoretyczną i specjalistyczną. O dojrzałości Doktorantki jako badaczki świadczy sposób przedstawienia własnych wyników badań w świetle dotychczasowej wiedzy i – co niezmiernie ważne – w oparciu o krytyczną weryfikację otrzymanych wyników. Doktorantka umiejętnie skonfrontowała własne wyniki z danymi zawartymi w piśmiennictwie liczącym 132 pozycje z lat 2000–2021. Na podstawie interesujących obserwacji Doktorantka poprawnie sformułowała wnioski, które uzasadniła w rzeczowej i logicznej „Dyskusji”. Treść „Dyskusji” świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i swobodnym poruszaniu się w temacie. Zabrakło mi jednak informacji, jak na tle własnych wyników przedstawiają się opisane w literaturze bezpośrednie oddziaływania białek sieci NET i histonów z neutrofilami w promowaniu adaptacyjnej, prozapalnej odpowiedzi immunologicznej. Pragnę także podkreślić, iż w trakcie lektury dysertacji doktorskiej można zaobserwować, jak Doktorantka z każdym kolejnym rozdziałem doskonali swój warsztat naukowca i coraz precyzyjniej formułuje swoje myśli.

Z racji powierzonej mi funkcji, pragnę dodać, iż moje drobne zastrzeżenie budzi forma stylistyczna i graficzna pracy doktorskiej, m.in. rozpoczynanie zdań od skrótów lub wartości procentowych zapisanych cyframi, użycie określeń „umieszczano w magnesie” zamiast „umieszczano w polu magnetycznym” lub „izolacji dokonano za pomocą separacji magnetycznej”, „płytki pługano” zamiast „komórki przepługano”, niekonsekwentne pisanie słowa „rycina” wielką literą i małą literą, używanie określenia „projekt” zamiast „praca doktorska”, brak polskiej czcionki na wszystkich rycinach oraz nieliczne niedociągnięcia edytorskie. Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej pracy doktorskiej.

#### **Pozostały dorobek naukowy**

Pozostały dorobek naukowy stanowi jedna wieloautorska i wielośrodkowa praca eksperymentalna opublikowana w *Frontiers in Immunology* (Impact Factor 7,561) wpisująca się w badania nad mechanizmami molekularnymi odpowiedzialnymi za dysfunkcję neutrofilii u osób zakażonych HIV, a także sześć prac opublikowanych w takich czasopismach jak: *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, *Magazyn Stomatologiczny*, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* oraz *Standardy Medyczne – Pediatria*.

### **Wniosek końcowy**

Mimo powyższych uwag natury językowej i redakcyjnej, pragnę wyrazić opinię, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej jest dokumentacją w pełni osiągniętych celów badawczych i stanowi bardzo wartościowy wkład w poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów kluczowych dla zmiany funkcjonowania neutrofilii z komórek przygotowanych do eliminacji patogenów na komórki odpowiedzialne za proces regeneracji tkanki oraz wskazanie miejsc startu transkrypcji genów związanych ze zmianą polaryzacji neutrofilii w kierunku komórki supresorowej.

**Stwierdzam, iż przedstawiona do oceny dysertacja doktorska spełnia ustawowe kryteria (art. 13, ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, DZ.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595, z późn. zm.), tj.: stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje szeroką teoretyczną wiedzę Doktoranta i potwierdza umiejętności Doktoranta w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. dent. Małgorzaty Kulińskiej-Michalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Brak opublikowania wyników otrzymanych w ramach przygotowania pracy doktorskiej jest jedyną przeszkodą, która nie pozwala mi na złożenie wniosku rekomendującego Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi podjęcia uchwały o wyróżnienie niniejszej rozprawy w związku z nowatorskim charakterem badań, bardzo wysoką jakością i interdyscyplinarnością prowadzonych badań oraz walorami poznawczymi i aplikacyjnymi przedstawionej pracy.**

*Dziękuję*  
20.04.2022r.