

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Pawła Piątka: ” Interakcja pomiędzy mielino-specyficznymi limfocytami CD49d+CD154+ a prekursorami oligodendrocytów jako kluczowy proces odpowiedzialny za zakłócanie prawidłowej remielinizacji w stwardnieniu rozsianym”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to w istocie cykl trzech prac oryginalnych o łącznym IF=16,968, w których autor jest pierwszym autorem. W badaniach przyjęta została hipoteza, iż upośledzona remielinizacja jest spowodowana niewłaściwym dojrzewaniem prekursorów oligodendrocytów warunkowanym interakcją z mielino-specyficznymi limfocytami T. Doktorant wyróżnił trzy cechy tych komórek, tj. specyficzny fenotyp (CD154+CD49d+), zdolność do migracji przez barierę krew-mózg oraz aktywność podziałową w odpowiedzi na stymulację antygenami osłonek mielinowych prezentowanych przez komórki prezentujące antygen.

W pierwszej pracy wykazano, że limfocyty odpowiadające proliferacją na specyficzną stymulację antygenami mieliny (MBP/MOG/PLP) mają fenotyp CD154+CD49d+ i jest ich więcej u pacjentów z RRMS. Komórki te wykazują tropizm do oligodendrocytów potwierdzony doświadczeniami typu transwell i w modelu zwierzęcym, a sama interakcja *in vitro* między tymi dwoma rodzajami komórek prowadzi do wyrzutu dużej ilości chemokin. Co ciekawe limfocyty CD49d+CD154+ w kontakcie z oligodendrocytami produkują chemokinę CXCL12, co może mieć znaczenie dla procesu remielinizacji.

W pracy zabrakło mi głębszej charakterystyki opisywanych limfocytów. O ile Autorzy piszą, iż w doświadczeniach typu transwell zaobserwowano, że większość komórek o fenotypie CD49d+CD154+ to były limfocyty CD3 (CD3 do CD19 jak 10 do 1), to nie podają żadnej głębszej charakterystyki tej populacji. Czy były to raczej limfocyty CD8 czy CD4? Czy ich profil czynników

transkrypcyjnych wskazywał na fenotyp Th1, Th2, Th17, Treg? Myślę, że dodałoby to znacznie więcej samej pracy.

Ciekawa byłaby też analiza klonalności komórek CD49d+CD154+ - czy jest to rozrost monoklonalny, oligoklonalny czy też repertuar TCR jest podobny do pozostałych limfocytów T? Odpowiedź na to pytanie miałaby kluczowe znaczenie dla całego cyklu prac bowiem możliwa byłaby ocena czy opisywane komórki indukują masywne zapalenie czy jest to precyzyjna antygenowo-specyficzna odpowiedź wybranych klonów limfocytów T, która zapewne pozostawia po sobie pamięć i z tego powodu jest niesłychanie groźna w kontekście możliwych kolejnych rzutów choroby.

Techniczne pytanie odnosi się do testu z CFSE użytego do analizy proliferacji limfocytów CD49d+CD154+. Z pracy wydaje się, że limfocyty te były sortowane na podstawie fluorescencji CD49d FITC, która pokrywa się z CFSE. W jaki sposób korygowano ten efekt przy odczycie testu (komórki niezależnie od podziałów nadal były CD49d FITC+)?

Czy i jakie znaczenie mogła mieć niezgodność HLA komórek linii MO3.13 i limfocytów CD49d+CD154+ użytych w kohodowlach dla uzyskanych wyników? W jaki sposób to ograniczenie metody było korygowane?

W drugiej pracy Autorzy opisali transformację dojrzewającego oligodendrogleju do komórek o właściwościach immunokompetentnych pod wpływem limfocytów CD49d+CD154+. Taki oligodendroglej różnił się istotnie w zakresie składu produkowanej mieliny oraz cytokin. Jednocześnie w pracy wykazano, że głównymi celami dla limfocytów CD49d+CD154+ są miR-665 oraz EEL3 (czynnik elongacyjny polimerazy II). Zaburzenia w zakresie poziomu tego miRNA były według Autorów przyczyną zmian aktywności polimerazy II i transkrypcji, a w konsekwencji opisywanych zmian w różnicowaniu oligodendrogleju. Co ciekawe, było to zjawisko charakterystyczne głównie w przypadku użycia limfocytów CD49d+CD154+ od osób chorych.

Praca w przekonujący sposób opisuje sekwencję zdarzeń w trakcie interakcji limfocytów CD49d+CD154+ i oligodendrocytów. Elementem, które wymagałby komentarza są przede wszystkim zmiany transkrypcji zaobserwowane jedynie w grupie chorej. Rozumiem prawa publikacji, która ogranicza możliwość dyskusji do konkretnej ilości słów, ale chętnie wysłuchałbym dlaczego według Doktoranta opisywane zmiany w zakresie aktywności polimerazy II i poziomu miRNA 665 dotyczyły jedynie grupy chorej.

W trzeciej pracy wykazano pozytywny wpływ mieszaniny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na syntezę elementów mieliny przez oligodendroglej zarówno w zwierzęcym modelu

autoimmunologicznego zapalenia mózgu, jak i w hodowlach ludzkich oligodendrocytów *in vitro*. Szczególne znaczenie tej pracy dotyczy po pierwsze tła choroby, która dotyka raczej bogatą „północ” globu, której dieta jest uboga w tłuszcze nienasycone. Po drugie, jest to wskazówka dietetyczna dla samych chorych, którzy mogą poprawić regenerację osłonek mielinowych, a tym samym swój stan zdrowia poprzez zmianę nawyków żywieniowych.

W uwagach zauważyłbym brak analizy składu lipidowego w ludzkim mózgu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym analogicznie do analizowanych mózgów mysich. Rozumiejąc aspekty etyczne i logistyczne w zakresie możliwości przeprowadzenia takiej analizy poprosiłbym jednak o szerszy komentarz dotyczący takich analiz z literatury.

W zakresie technicznych aspektów pracy zastanowiła mnie suplementacja hodowli oligodendrocytów badaną mieszanką kwasów tłuszczowych. Dlaczego 5% roztwór FOM? Czy jest tutaj jakaś analogia do stężenia kwasów tłuszczowych *in vivo*?


Biorąc pod uwagę całość rozprawy uważam ją za niezwykle ciekawą i nowatorską. Moje uwagi są podyktowane raczej ciekawością aniżeli chęcią wskazywania braków. Ten typ rozpraw jest zresztą najbardziej przyjazny recenzentowi, bo każdą z prac oceniał już zarówno edytor, jaki i kilku recenzentów. Biorąc pod uwagę współczynnik oddziaływania pisma, w którym opublikowano wyniki, należy dodatkowo podkreślić, iż zapewne był to bardzo kompetentny zespół recenzentów.

Chciałbym też podkreślić duży wkład pracy w uzyskanie przedstawionych wyników oraz biegłość Autora w różnorodnych technikach laboratoryjnych. Oczywiście w przypadku prac wielozespołowych zapewne część oznaczeń realizowana była przez inne zespoły, ale równie ważna jest tutaj umiejętność wykorzystania technik oferowanych przez różne specjalności biomedyczne i biegłe połączenie wyników w zwartą logiczną całość. Sam Autor podkreśla natomiast, iż prace wykorzystują oryginalne modele badawcze stworzone w Zespole, w którym realizował pracę doktorską, tj. ludzki model kohodowli *in vitro* dojrzewających oligodendrocytów z limfocytami CD49d+CD154+ oraz mysi model hodowli prekursorów oligodendrocytów.

Oceniając pracę całościowo należy uwypuklić jej adekwatność do współczesnych poszukiwań patogenezy chorób autoimmunologicznych i autozapalnych. Dociekliwa analiza mechanizmów niszczenia mieliny przez układ odpornościowy, ale także próba znalezienia sposobów spowolnienia tego procesu, stanowią nowatorski wkład w badania nad stwardnieniem rozsianym. Uniwersytet Medyczny w Łodzi od lat jest liderem badań nad stwardnieniem rozsianym w skali międzynarodowej, a niniejsza praca po raz kolejny potwierdza tę pozycję.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie magistra Pawła Piątka do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego o wyróżnienie pracy ze względu na jej wartości merytoryczne i warsztatowe. Bardzo podoba mi się hipoteza badawcza i sposób prowadzenia badań w oparciu o modele choroby z użyciem materiału realnych pacjentów. Unikalne doświadczenia zdobyte przy realizacji przewodu doktorskiego mogą zapewne posłużyć do dalszego rozwoju tego kierunku badań i – miejmy nadzieję - implikacji w praktyce klinicznej dla dobra chorych.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski