



Łódź, 10 kwietnia 2022 r.

**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
magdalena.druszczyńska@biol.uni.lodz.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pastwińskiej na temat:
„Regulacja procesu adhezji komórek tucznych do składników macierzy
pozakomórkowej w warunkach niedoboru tlenu”**

Reakcja zapalna jest wyrazem, zachodzącej na poziomie lokalnym lub ogólnoustrojowym, ukierunkowanej odpowiedzi odpornościowej, hematologicznej i biochemicznej wzbudzonej przez czynnik zapalny. Ma ona charakter wieloetapowy, cechuje się określoną dynamiką i sekwencją procesów, w których uczestniczą liczne populacje komórek dążące do neutralizacji czynnika sprawczego oraz uruchomienia procesów naprawczych celem przywrócenia równowagi fizjologicznej.

Jedną z populacji komórek o kluczowym znaczeniu dla przebiegu zapalenia są komórki tuczne (mastocyty), których zadaniem jest aktywacja i regulacja mechanizmów odpowiedzi odpornościowej za pośrednictwem wydzielanych do środowiska rozpuszczalnych mediatorów. Jednakże nadmierna aktywacja tych komórek może przyczyniać się do rozwoju reakcji zapalnej o charakterze patologicznym.

To właśnie w nurt badań nad mechanizmami angażującymi komórki tuczne w rozwój reakcji zapalnej wpisuje się problematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej realizowanej przez mgr Joannę Pastwińską pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Dastycha w Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Pracowni Immunologii Komórkowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Doktorantka podjęła w niej próbę odpowiedzi na istotne, również

z punktu medycznego, pytanie, czy i w jaki sposób proces adhezji mastocytów do komponentów macierzy pozakomórkowej może podlegać zmianom w warunkach niedoboru tlenu, wpływając na rozwój i przebieg procesu zapalnego. Podjęty temat uważam za w pełni uzasadniony pod względem poznawczym oraz ważny w kontekście terapeutycznym w związku z możliwością kontrolowania reakcji zapalnej powiązanej z hipoksją. Interakcje komórek immunokompetentnych z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej odgrywają ważną rolę m.in. w procesach naprawczych, których przebieg w warunkach hipoksji może być zaburzony. Niedotlenienie tkanek może być m.in. następstwem chorób infekcyjnych toczących się w drogach oddechowych lub chorób o podłożu immunologicznym, którym towarzyszy przewlekła reakcja zapalna. Sama hipoksja może być też czynnikiem sprawczym lub nasilającym reakcję zapalną, a zatem znajomość mechanizmów warunkujących oddziaływanie komórek tucznych z białkami zewnątrzkomórkowej macierzy zewnątrzkomórkowej w warunkach hipoksji może mieć znaczenie dla opracowania sposobów leczenia stanów zapalnych, które rozwijają się w takich warunkach.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Pastwińskiej stanowi zbiór trzech publikacji naukowych, w tym dwóch prac doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej, opatrzonych 13-stronicowym opracowaniem, uwzględniającym opis metod badawczych i uzyskanych wyników badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej. Na zbiór ten składają się następujące artykuły:

(1) Pastwińska J., Walczak-Drzewiecka A., Łukasiak M., Ratajewski M., Dastych J. *Hypoxia regulates human mast cell adhesion to fibronectin via PI3K/AKT signaling pathway. Cell Adh Migr.* 2020, 14: 106-117, doi: 10.1080/19336918.2020.1764690;

(2) Pastwińska J., Żelechowska P., Walczak-Drzewiecka A., Brzezińska-Błaszczyk E., Dastych J. *The art of mast cell adhesion. Cells.* 2020, 9: 2664, doi:10.3390/cells9122664;

(3) Pastwińska J., Walczak-Drzewiecka A., Kozłowska E., Harunari E., Ratajewski M., Dastych J. *Hypoxia modulates human mast cell adhesion to hyaluronic acid. Immunol Res* 2021; doi:10.1007/s12026-021-09228-x.

Jako recenzent stwierdzam, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki, co stanowi spełnienie wymogu ustawowego. Z obowiązku recenzenta dodam tylko, że zgodnie z bazą Pubmed publikacja numer 3 powinna być cytowana jako: *Pastwińska J., Walczak-Drzewiecka A., Kozłowska E., Harunari E., Ratajewski M., Dastyk J. Hypoxia modulates human mast cell adhesion to hyaluronic acid. Immunol Res. 2022 Apr;70(2):152-160. doi: 10.1007/s12026-021-09228-x.*, co w niczym nie zmienia ważności przedstawionego do recenzji cyklu. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) wymienionych prac wynosi 12,834, co odpowiada 340 punktom MNiSW (według wskaźników w roku publikacji). Wszystkie prace zostały opublikowane w ciągu ostatnich 2 lat, a ich indywidualny IF wynosi od 2,829 do 6,600. Pani mgr Joanna Pastwińska jest pierwszym autorem wszystkich trzech ujętych w cykl publikacji, a, jak wynika z załączonych do pracy oświadczeń, wkład współautorski Doktorantki wynosi odpowiednio, w publikacji (1) 50%, w publikacji (2) 60%, w publikacji (3) 55%. Wkład pozostałych współautorów waha się od 5% do 20%, co wskazuje na istotną rolę Doktorantki w planowaniu badań, ich wykonaniu, opracowywaniu wyników i przygotowaniu prac do druku. Uznać więc należy, że osobiście przeprowadziła zdecydowaną większość omawianych doświadczeń. Tym samym cykl publikacji składających się na niniejszą dysertację spełnia minimum określone w warunkach ubiegania się o stopnie naukowe lub tytuł naukowy w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi zgodnie z uchwałą nr 30/2017 z dnia 26 stycznia 2017 r. Senatu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie warunków ubiegania się o nadanie stopni naukowych lub tytułu naukowego w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Ocena merytoryczna

Recenzowana rozprawa doktorska ma układ typowy dla dysertacji przygotowanych w oparciu o dorobek publikacyjny. Składa się ona z krótkiego *Wprowadzenia*, przedstawienia *Celu pracy*, zwięzłego opisu *Metodyki* prowadzonych *badań*, syntetycznego *Omówienia* uzyskanych *wyników*, prezentacji *Wniosków*, krótkiego *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, a także *Bibliografii* wykorzystanej do przygotowania w/w opracowania. Do pracy załączono kopie publikacji będące podstawą rozprawy, oświadczenia współautorów tych prac z podaniem zakresu oraz procentowego udziału w ich powstaniu, a także wykaz pozostałego dorobku naukowego Doktorantki.

W przygotowanym *Wprowadzeniu* mgr Joanna Pastwińska zawarła krótką charakterystykę reakcji zapalnej i procesu adhezji komórkowej w rozwoju tej reakcji, opisała rolę komórek tucznych w procesach odpornościowych oraz wpływ hipoksji na rozwój stanu zapalnego. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o krótkie odniesienie się do informacji zamieszczonej na stronie 2 *Wprowadzenia*, cytując: „*Niedotlenienie, poprzez aktywację szlaku sygnałowego HIF-1, może zwiększać ekspresję receptorów integrynowych na komórkach układu odpornościowego wpływając na wzrost ich adhezji m.in. do macierzy pozakomórkowej*”. Ze względu na fakt, że czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. hypoxia-inducible factor 1) odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi adaptacyjnej komórek na hipoksję, proszę o krótkie omówienie jego roli w przeprogramowaniu metabolizmu komórkowego i osiągnięciu stanu adaptacji komórek do warunków hipoksji.

Po interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr Joanna Pastwińska przedstawiła *Cel pracy* zdefiniowany jako ocena wpływu obniżonego stężenia tlenu na adhezję komórek tucznych, który realizowano wydzielając trzy zasadnicze zadania badawcze obejmujące: (1) ocenę adhezji ludzkich mastocytów w warunkach hipoksji do wybranych składników macierzy pozakomórkowej, w tym do kolagenów typu I-IV, fibronektyny, kwasu hialuronowego, lamininy i witronektyny; (2) określenie wpływu hipoksji na ekspresję receptorów, w tym integryn, CD44 oraz RHAMM/HMMR, swoistych dla fibronektyny i kwasu hialuronowego; (3) wyjaśnienie mechanizmów warunkujących zależną od hipoksji adhezję mastocytów do fibronektyny i kwasu hialuronowego. Cel główny pracy wraz z pozwalającymi go zrealizować celami cząstkowymi został przedstawiony w sposób jasny i logiczny stanowiąc dobre uzasadnienie podjętych przez Doktorantkę badań. Proszę o uściślenie, czy zadanie 1 miało charakter badań wstępnych?

Wymienione w rozdziale *Metodyka badań*, a opisane szczegółowo w publikacjach stanowiących zręb doktoratu, techniki badawcze nie budzą żadnych zastrzeżeń. Wszystkie zaplanowane doświadczenia prowadzono w warunkach *in vitro* wykorzystując linię komórek tucznych LAD2 człowieka udostępnioną przez dra Arnolda Kirshenbauma z Laboratory of Allergic Diseases, National Institute of Allergy and Allergic Diseases, Bethesda, USA. Czując pewien niedosyt odnośnie podanego przez Autorkę uzasadnienia wyboru użytej do badań linii komórkowej, zwracam się z prośbą o przedstawienie krótkiej jej charakterystyki, a także wyjaśnienie podobieństw i różnic pomiędzy wykorzystaną linią

a innymi dostępnymi liniami komórek tucznych. Czy w opinii Doktorantki wyniki badań uzyskane z użyciem linii LAD2 mogą być odnoszone do innych linii komórek tucznych? Realizując postawione w doktoracie cele mgr Joanna Pastwińska wykazała się umiejętnością zastosowania różnych narzędzi badawczych w zakresie technik hodowlanych i analitycznych, co pozwala ocenić wysoko warsztat metodyczny Doktorantki. Podkreślę też, że wszystkie uzyskane przez mgr Joannę Pastwińską wyniki zostały poddane wieloparametrycznej analizie statystycznej z Jej udziałem.

W rozdziale *Omówienie wyników* Doktorantka przedstawiła skrótowo główne rezultaty uzyskane w ramach kolejnych etapów prowadzonych badań. Pełne spektrum analiz wraz z merytoryczną dyskusją otrzymanych wyników zostało przedstawione w publikacjach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Tematyka wszystkich wchodzących w skład recenzowanej dysertacji prac jest związana z adhezją komórkową, która jest jednym z podstawowych procesów zachodzących w żywym organizmie wpływającym na proliferację, różnicowanie, migrację czy żywotność komórek. W pracy przeglądowej zatytułowanej *The art of mast cell adhesion (Cells 2020, 9: 2664)* mgr Joanna Pastwińska przedstawiła szeroką charakterystykę tego ważnego mechanizmu komórkowego przebiegającego z udziałem komórek odpornościowych, w tym komórek tucznych, omawiając szczegółowo między innymi funkcje cząsteczek adhezyjnych umożliwiających interakcje międzykomórkowe mastocytów oraz ich wiązanie ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej. W abstrakcie omawianej publikacji znajduje się informacja, że zrozumienie tych komórkowych mechanizmów pozwoli na pogłębienie wiedzy na temat biologii mastocytów, a także na poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych nacelowanych na te komórki. Nawiązując do tego wątku, proszę Doktorantkę o krótkie omówienie stosowanych obecnie terapii ukierunkowanych na komórki tuczne i w jakich stanach chorobowych takie terapie są stosowane.

Praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy, stanowi dobre tło do omówienia prowadzonych badań, w których Doktorantka oceniła wpływ hipoksji na aktywność mastocytów linii LAD2, a w szczególności na ich zdolność adhezji do wybranych składników pozakomórkowej macierzy - kolagenu typu I-IV, fibronektyny, kwasu hialuronowego, lamininy i witronektyny. Badania wstępne przeprowadzone w warunkach dostępności tlenu wykazały spontaniczne przyleganie nieaktywowanych komórek LAD2 wyłącznie do fibronektyny i kwasu hialuronowego, dlatego też w dalszych badaniach

Doktorantka skoncentrowała się na tych dwóch komponentach zewnątrzkomórkowej macierzy. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, czy na aktywowanych komórkach tucznych, które w taki stan przechodzą podczas rozwoju reakcji zapalnej, nie dochodzi do ekspresji cząsteczek adhezyjnych, które warunkowałyby interakcje z innymi białkami zewnątrzkomórkowej macierzy? Wiadomo bowiem, że podczas inicjacji reakcji zapalnej na innych komórkach odpornościowych depozycji ulegają adhezyny, których nie ma na komórkach w stanie spoczynku. Zatem, czy interakcja komórek tucznych z fibronektyną lub kwasem hialuronowym jest dla tych komórek unikatowa?

Indukowanemu hipoksją mechanizmowi regulacji adhezji komórek tucznych do fibronektyny poświęcona jest pierwsza publikacja oryginalna wchodząca w skład dysertacji o tytule *Hypoxia regulates human mast cell adhesion to fibronectin via PI3K/AKT signaling pathway* (*Cell Adh Migr* 2020, 14: 106-117). Pani mgr Joanna Pastwińska pisze, iż uzyskane przez Nią wyniki po raz pierwszy wskazują na udział ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydiloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/AKT) oraz receptorów integrynowych $\alpha 5/\beta 1$ w procesie adhezji mastocytów do fibronektyny w warunkach niedoboru tlenu, co może mieć istotne znaczenie dla akumulacji tych komórek w ogniskach objętych procesem zapalnym. Druga publikacja zawierająca oryginalne wyniki Doktorantki zatytułowana *Hypoxia modulates human mast cell adhesion to hyaluronic acid* (*Immunol Res* 2021; doi:10.1007/s12026-021-09228-x.) dotyczy oceny wpływu hipoksji na ekspresję receptorów kwasu hialuronowego oraz adhezję mastocytów do tego składnika zewnątrzkomórkowej macierzy. Ciekawym rezultatem jest obserwowane w warunkach hipoksji zahamowanie adhezji komórek tucznych do kwasu hialuronowego, co Autorka tłumaczy zmianami konformacyjnymi receptora CD44 odpowiedzialnymi za regulację powinowactwa receptora do ligandu. Doktorantka wysuwa wniosek, że „podobnie jak w przypadku fibronektyny, regulacja adhezji mastocytów do kwasu hialuronowego zachodząca w warunkach niedoboru tlenu może stanowić mechanizm warunkujący infiltrację i gromadzenie się tych komórek do tkanek objętych stanem zapalnym”. Prosiłabym Doktorantkę o szersze umotywowanie tego wniosku, bowiem wyniki uzyskane dla interakcji komórek tucznych z fibronektyną i kwasem hialuronowym są przeciwstawne. W przypadku interakcji z fibronektyną sugerowane jest nasilenie wiązania, co może sprzyjać utrzymaniu się komórek w niszy zapalnej, natomiast w odniesieniu do kwasu hialuronowego adhezja mastocytów w warunkach hipoksji jest hamowana.

Omówienie wyników kończy rozdział *Wnioski*, w którym mgr Joanna Pastwińska przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. W mojej opinii brakuje w nim syntetycznego ujęcia omawianych w poprzednim rozdziale wyników, a stworzenie takiego podsumowania potwierdziłoby zdolności Doktorantki do uogólniania i wyciągania wniosków na podstawie opracowanych danych. W opisie brakuje też spojrzenia w przyszłość i zaproponowania przez Autorkę możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników. Proszę zatem mgr Joannę Pastwińską o uzupełnienie i krótki komentarz w tym zakresie.

Recenzowaną rozprawę kończy *Streszczenie* przygotowane w języku polskim i angielskim, napisane poprawnie, dobrze oddające treści zawarte w dysertacji oraz rozdział *Piśmiennictwo*, w którym wykorzystano 26 pozycji właściwie dobranej, wyłącznie anglojęzycznej, literatury naukowej opublikowanej w latach 1996-2017. Wszystkie pozycje bibliograficzne zostały zacytowane w tekście poprawnie.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wszystkie ustawowe warunki stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora. Wysoki udział procentowy mgr Joanny Pastwińskiej w publikacjach wchodzących w skład pracy doktorskiej potwierdza Jej istotny udział w prowadzonych badaniach. Wysoko oceniam zarówno wartość merytoryczną wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, jak również przedstawione opracowanie w języku polskim będące skrótowym omówieniem celu naukowego i uzyskanych wyników. Poszczególne rozdziały dysertacji zostały opracowane przez mgr Joannę Pastwińską z dużą starannością i właściwymi odnośnikami literaturowymi, a zastosowane przez Nią metody zostały odpowiednio dobrane i wykorzystane do osiągnięcia zdefiniowanych w pracy doktorskiej celów. Zaprezentowane przez mgr Joannę Pastwińską wyniki badań wskazują na umiejętność planowania i prowadzenia badań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych, a także dużą wiedzę teoretyczną. Należy również podkreślić wartość naukową pozostałego dorobku naukowego Doktorantki, który aktualnie liczy 6 publikacji (2 oryginalne i 4 przeglądowe) o łącznym IF=22,235, co odpowiada 380 pkt MNiSW, w dwóch spośród których Doktorantka jest pierwszym autorem. Na jej dorobek naukowy składa się także 6 doniesień na zjazdach o zasięgu krajowym i międzynarodowym.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Pastwińskiej posiada istotną wartość poznawczą i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Doceniając wysoki poziom merytoryczny zaprezentowanych publikacji wchodzących w skład rozprawy świadczą o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pastwińskiej stosowną nagrodą.

KATEDRA IMMUNOLOGII
I BIOLOGII INFEKCYJNEJ UŁ



..... dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ

dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ