

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Łódź dnia 12.11.2024r.

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki,

Instytut Mikrobiologii Biotechnologii i Immunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

Tel: (42) 6354186,

e. mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl



Prof. dr hab. n. med.

Maciej Kupczyk

Przewodnicząca Rady Nauk Medycznych

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Al. Kościuszki 4, 90-419 Łódź

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Michalak-Wikalińskiej

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne pt: „Ocena apoptozy limfocytów krwi obwodowej w odniesieniu do wybranych markerów odpowiedzi nieswoistej”, opracowana przez Panią mgr Annę Michalak-Wikalińską stanowi tematyczną monografię.

Uzasadnienie podjęcia badań. Przesłanką do podjęcia przez Doktorantkę badań w powyższym temacie są zmiany w środowisku życia ludzi związane z rosnącym zanieczyszczeniem powietrza bioaerozolami, w przestrzeniach wewnętrznych, co może mieć negatywny wpływ na dobrostan zdrowotny człowieka. W składzie tych aerozoli znajdują się wirusy, bakterie, zarodniki grzybów, ich metabolity oraz toksyny, które mogą wnikać do organizmu gospodarza bezpośrednio lub osadzone na nośnikach przemysłowych inicjując rozwój procesów odpornościowych. Z jednej strony jest to zjawisko pożądane ponieważ służy eliminacji zagrożeń infekcyjnych. Jednakże, po eliminacji czynników zakaźnych i ich komponentów mechanizmy odpornościowe powinny zostać wygaszone aby przywrócić stan homeostazy organizmu. Inaczej, utrzymująca się aktywność komórek odpornościowych może sprzyjać rozwojowi chorób z autoimmunizacji, chorób alergicznych, niewydolności oddechowej, nowotworów płuc, a także chorób naczyniowych. Autorka podkreśla, że dysfunkcje mechanizmów regulujących aktywność komórek immunokompetentnych, w tym

zaburzenia w przebiegu programowanej śmierci komórkowej – apoptozy, mogą skutkować rozwojem procesów patologicznych wskutek przewlekłej aktywacji limfocytów T.

Układ pracy. Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac doświadczalnych. Składowymi pracy są: Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Cel pracy, rozdział Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim oraz Piśmiennictwo.

W szeroko opracowanym Wstępie Autorka uwzględniła m.in. współczesne poglądy na temat rozwoju poszczególnych etapów odpowiedzi odpornościowej, rolę czynników endogennych, a także znaczenie mikrobioty człowieka w programowaniu układu odpornościowego. Zwraca uwagę na malejącą aktywność układu odpornościowego wraz z wiekiem oraz czynniki sprzyjające niedoborom odpornościowym. Charakteryzuje wybrane komponenty czynników zakaźnych stanowiące tzw. wzorce molekularne, które są rozpoznawane przez komórki immunokompetentne granulocyty, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, a także aktywowane limfocyty, co skutkuje aktywacją tych komórek i rozwojem reakcji zapalnej, która jeśli jest nadmierna lub przewlekła może przyczyniać się do rozwoju chorób. Szczególne miejsce we Wstępie zajmuje problematyka niekorzystnego oddziaływania bioaerozoli wewnętrznych na układ odpornościowy, charakterystyka limfocytów i ich funkcji efektorowych, apoptozy jako procesu regulującego zwrotnie aktywność tych komórek oraz wyjaśnienie roli w tym procesie wybranych cytokin i mediatorów rozpuszczalnych.

Cel badań. Biorąc pod uwagę zagrożenia wynikające z oddziaływania aerozoli wewnętrznych na układ odpornościowy człowieka Autorka za cel pracy obrała zbadanie w modelu eksperymentalnym *in vitro* wyznaczników apoptozy limfocytów krwi obwodowej zdrowych dawców po ekspozycji na wybrane komponenty aerozoli jakimi mogą być lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych, enterotoksyna A gronkowców oraz wirusy paragrypy typu 3. Badania te połączyła z oceną poziomu wybranych nieswoistych mediatorów rozpuszczalnych oraz nasileniem ekspresji wybranych receptorów typu Toll rozpoznających wzorce molekularne czynników zakaźnych.

Cele szczegółowe. Badania eksperymentalne obejmowały następujące etapy:

- otrzymanie frakcji limfocytów z kożuszków leukocytarnych zdrowych dawców, metodą separacji immunomagnetycznej. Żywotność limfocytów przed ekspozycją mieściła się w zakresie 95-98%, co potwierdziło możliwość użycia tych komórek w dalszych badaniach,
- ekspozycję limfocytów przez 48 godzin w hodowlach *in vitro* na LPS, enterotoksynę gronkowcową lub wirusy paragrypy typu 3 lub fitohemgalutyninę (PHA); komórki w samym podłożu hodowlanym stanowiły tzw. kontrolę reakcji spontanicznej; **Proszę Doktorantkę o uzasadnienie wyboru PHA jako kontroli w przeprowadzonych badaniach,**
- oznaczenie apoptozy limfocytów z podziałem na subpopulacje: CD4+, CD8+, CD56+, metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem zestawu handlowego z Annexyną V znakowaną izotiocjanianem fluoresceiny (FITC),
- oznaczenie w nadsącach hodowlanych, w teście ELISA, rozpuszczalnych wyznaczników apoptozy (granzymu B, kaspazy-1, TNF- α oraz białka Fas), wybranych cytokin prozapalnych (IL17A) lub przeciwzapalnych i regulatorowych (IL-10, IL-22), oraz katelicydyny LL-37 negatywnie regulującej reakcję zapalną inicjowaną przez receptory TLR,
- oznaczenie metodą PCR w czasie rzeczywistym poziomu ekspresji mRNA genów receptorów TLR1 (rozpoznających głównie lipoproteiny osłon bakterii), TLR3 (rozpoznających dwuniciowe RNA wirusów) oraz TLR4 (rozpoznających głównie bakteryjny LPS, a także mannan grzybów lub białka osłonek wirusów),

- zbadanie zależności pomiędzy nasileniem apoptozy limfocytów a poziomem badanych mediatorów rozpuszczalnych i nasileniem ekspresji receptorów TLR

Materiały i Metody. Zaproponowane komórki docelowe - limfocyty, wyznaczniki procesu apoptozy, a także mediatory i receptory odpowiedzi nieswoistej zostały wybrane w sposób dobrze przemyślany. Również wybór metodyki badań nie budzi zastrzeżeń.

Mam jedną uwagę praktyczną dotyczącą opracowania rozdziału Materiały i Metody. Zwyczajowo podając nazwy odczynników i sprzętu należy również uwzględnić nazwę producenta oraz miasto i państwo, w którym mieści się siedziba firmy.

Uzyskane wyniki badań zostały opracowane i poddane szczegółowej analizie statystycznej za pomocą właściwych testów i zaprezentowane w formie tabel i/lub wykresów. **W odniesieniu do prezentacji wyników mam również uwagę dotyczącą zróżnicowania na poszczególnych wykresach skali, co utrudnia porównywanie wyników.**

Wyniki i ich interpretacja

Do najważniejszych wyników i wniosków z oznaczania apoptozy i stężenia nieswoistych mediatorów rozpuszczalnych, w nadsączach z hodowli limfocytów, należą:

- wykazanie, że po ekspozycji limfocytów przez 48 godzin na użyte stymulatory: LPS, enterotoksynę gronkowcową, wirusy paragrypy typu 3, a także PHA istotnie wzrastał odsetek limfocytów CD4+, CD8+ lub CD56+ ulegających apoptozie,
- wykazanie, że nasilenie apoptozy limfocytów w środowisku badanych stymulatorów było skorelowane ze wzrostem stężenia w nadsączach hodowlanych rozpuszczalnych mediatorów apoptozy: kaspazy 1, białka Fas/CD95 oraz TNF- α , co pozwala sugerować potencjalne mechanizmy tego procesu,
- wykazanie nasilenia wytwarzania granzymu B oraz katelicydyny LL-37 w hodowlach limfocytów stymulowanych LPS, enterotoksyną gronkowcową lub PHA, ale nie wirusami paragrypy typu 3 (stężenie granzymu B było nawet niższe niż w hodowli niestymulowanej),
- wykazanie istotnie podwyższonego poziomu IL-10 w hodowlach limfocytów eksponowanych na badane stymulatory, w tym najsłabszej odpowiedzi na wirusy paragrypy typu 3,
- wykazanie istotnego wzrostu stężenia IL-17A w nadsączach z hodowli limfocytów eksponowanych na LPS, enterotoksynę gronkowcową (efekt najsilniejszy) lub PHA, ale nie po ekspozycji na Wirusy paragrypy typu 3 (stężenie IL-17A było niższe niż w hodowli niestymulowanej),
- wykazanie wzrostu stężenia IL-22 w odpowiedzi na PHA, toksynę gronkowcową, ale nie LPS lub wirusy paragrypy typu 3,

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sugeruje, że poszczególne mediatory odpowiedzi nieswoistej w zależności od ich stężenia mogą w istotny sposób modulować proces apoptozy limfocytów.

Do najważniejszych wyników i wniosków z oznaczania ekspresji mRNA genów receptorów TLR1, TLR3 oraz TLR4 w należą:

- wykazanie nasilenia ekspresji mRNA genu TLR1 po 24 godzinach ekspozycji limfocytów na LPS, enterotoksynę gronkowcową lub wirusy paragrypy typu 3, ale nie PHA oraz istotne obniżenie

ekspresji mRNA tego genu po 48 godzinach ekspozycji limfocytów na badane komponenty czynników zakaźnych,

- wykazanie nasilenia ekspresji mRNA genu TLR3 po 24 godzinach ekspozycji limfocytów na badane stymulatory czynników zakaźnych lub PHA i dalszy wzrost ekspresji mRNA tego genu, ale tylko w hodowlach zawierających wirusy paragrypy typu 3,

- wykazanie nasilenia ekspresji mRNA genu TLR4 po 24 godzinach ekspozycji limfocytów na LPS, enterotoksynę gronkowcową lub wirusy paragrypy typu 3, ale nie PHA, oraz dalsze nasilenie ekspresji mRNA tego receptora po 48 godzinach stymulacji LPS, a obniżenie w środowisku wirusów paragrypy typu 3,

Na podstawie wyników tej części pracy Autorka wnioskuje, że ekspresja mRNA genów badanych receptorów TLR zależy od rodzaju stymulatora i czasu ekspozycji limfocytów.

Analizując wyniki badań zaprezentowane w pracy przez Doktorantkę nasuwają się pewne spostrzeżenia wskazujące na zróżnicowanie odpowiedzi limfocytów i działania badanych stymulatorów.

Wydaje się, iż bardziej podatnymi na apoptozę pod wpływem badanych czynników są limfocyty CD4+ niż CD8+ lub CD56+.

Ponadto, w kategorii limfocytów CD4+ najmniej komórek ulegało apoptozie w odpowiedzi na wirusy paragrypy typu 3, spośród użytych komponentów czynników zakaźnych. Ten efekt pozostawał w związku z nasileniem ekspresji mRNA głównie receptora TLR3, choć w hodowlach 24 godzinnych, ale już nie 48 godzinnych, wykazano nasiloną ekspresję mRNA TLR1 i TLR4. Indukcja apoptozy była wzbudzana prawdopodobnie głównie na szlaku FAS zależnym. Ciekawe jest również spostrzeżenie, że wirusy najstabiliej indukowały wytwarzanie mediatorów regulatorowych: katelicydyny LL-37, IL-10 lub IL-22, ale także prozapalnej IL-17A. W odniesieniu do katelicydyny LL-37 i IL-17A stężenia tych mediatorów były nawet niższe niż w hodowli limfocytów w samym podłożu, co wskazywałoby na działanie hamujące wirusów.

Dla porównania apoptoza limfocytów w odpowiedzi na enterotoksynę gronkowcową była prawdopodobnie zależna głównie od TNF- α i ścieżki FAS zależnej. Zwraca również uwagę nasilenie ekspresji mRNA TLR3 w stosunku do kontroli spontanicznej i najwyższy poziom prozapalnej IL-17A. W hodowlach stymulowanych LPS, można sugerować dominujący udział ścieżki zależnej od TNF- α w indukowaniu apoptozy i rolę receptora TLR4. Po stymulacji limfocytów enterotoksyna lub LPS wykazano istotny wzrost stężenia regulatorowej IL-10.

Jak można wytłumaczyć zaobserwowane różnice pomiędzy efektami wzbudzonymi przez wirusy w porównaniu do efektów wzbudzanych przez komponenty bakteryjne i czy mogą one mieć znaczenie w kontekście ekspozycji na bioaerozole?

Wyjaśniając założenia pracy Autorka podkreśliła, że dysfunkcje mechanizmów regulujących aktywność komórek immunokompetentnych, w tym zaburzenia przebiegu programowanej śmierci komórkowej – apoptozy, mogą skutkować rozwojem procesów patologicznych wskutek przewlekłej aktywacji limfocytów T. Podsumowując wyniki badań własnych zaznaczyła, że kierowanie komórek na drogę apoptozy po ich stymulacji przez badane komponenty czynników zakaźnych może ograniczać rozwój skutecznych procesów odpornościowych. **Zatem ciekawa jestem komentarza Doktorantki czy uzyskane wyniki mogą wskazywać „na uruchamianie w limfocytach apoptozy jako mechanizmu protekcyjnego przed nadmierną ich aktywacją” w odpowiedzi na badane stymulatory, czy też kierowanie limfocytów na drogę apoptozy w odpowiedzi na badane czynniki należy uznać za proces nieprawidłowy i w konsekwencji niekorzystny.**

Chciałabym również poprosić Doktorantkę o komentarz, jak postrzegana jest ekspozycja na bioaerozole, w odniesieniu do roli czynników infekcyjnych i ich komponentów w programowaniu układu odpornościowego we wczesnym rozwoju osobniczym, w kierunku optymalnego rozwoju mechanizmów odpornościowych. Jaki jest aktualny pogląd w tej kwestii biorąc pod uwagę „teorię higieny”.

Uwagi edytorskie

W opisie wyników znajdują się pewne nieścisłości:

- **Na stronie 123** podano ten sam wynik dla PHA i LPS przy wyznaczaniu istotności statystycznej,
- **Na stronie 146** w opisie wyników i **na stronie 147** w podsumowaniu wyników dotyczących ekspresji mRNA genu dla TLR1 (w punkcie 4) pomyłkowo podano „wzrost ekspresji”,
- **Na stronie 152**, w opisie jest „wzrost ekspresji mRNA genu TLR4 po 24 godzinach hodowli limfocytów w próbie stymulowanej PHA w odniesieniu do próby spontanicznej” zamiast obniżenie ekspresji

W tekście są również nieliczne błędy edytorskie – literowe, które jednak nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowanie

Podsumowując, w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej został wytyczony ważny cel badawczy związany z próbą wyjaśnienia wpływu komponentów biologicznych występujących w bioaerozolach wewnętrznych na proces apoptozy limfocytów z uwzględnieniem oznaczenia ilościowego wybranych mediatorów nieswoistych. Takie podejście badawcze jest bardzo interesujące. Świadczy o zrozumieniu przez Doktorantkę wpływu infekcyjnych czynników środowiskowych na funkcjonowanie układu odpornościowego. Na podkreślenie zasługuje szeroka dyskusja wyników w odniesieniu do wyników badań innych autorów, co w mojej opinii stanowi atut tej pracy. Pragnę również podkreślić, duży wysiłek Doktorantki włożony w analizę wyników badań, a poczynione obserwacje stanowią przesłankę do dalszych badań.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu mojej opinii pragnę wyrazić, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa w formie monografii spełnia wszelkie kryteria stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Na tę opinię składają się wyznaczony cel pracy, zaplanowane badania, sposób ich wykonania, prezentacja i analiza uzyskanych wyników oraz rzetelna dyskusja. Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medyczne oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art.13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art.179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.), co upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosku o dopuszczenie Pani mgr Anny Michalak-Wikalińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

KIEROWNIK
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ
M. M. Chmiela
prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

