

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 1.9.2024.....
L.dz. 412.....

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Darii Lorek pt. **Udział receptora TLR9 limfocytów B w regulacji tolerancji immunologicznej w ciąży**

Uprzejmie dziękuję Wysokiej Radzie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu za powierzenie mi recenzowania tej interesującej rozprawy. Przedstawiona do oceny dysertacja napisana jest w układzie tradycyjnym, tj wprowadzenie (Wstęp), Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Jest mi znany fakt, że grupa naukowa, którą reprezentuje doktorantka od dłuższego czasu „lansuje” w literaturze międzynarodowej udział tzw. limfocytów Breg oraz receptora TLR9 regulującego aktywność limfocytów B czy to w postaci subpopulacji Breg (co prawda bez jasno określonego fenotypu), czy w postaci komórek APC (o czym świadczy w dużej mierze obserwacja czynników kostymulujących, biorących udział w interakcji pomiędzy APC a odpornościowymi komórkami T). Doktorantka brała udział we wcześniejszych publikacjach tej grupy badawczej (pod kierunkiem prof. Anny Chełmońskiej-Soyty) np. udowadniając rolę ekspresji interleukin 35 i 10 w tzw. komórkach B regulatorowych u myszy służących za model pro-aborcyjny oraz w normalnej ciąży. Jednak model myszy wymyślonej przez Dawida Clarka oraz Gerarda Chaouat jest jedynie modelem przybliżonym dla ciąży zagrożonej. W większej mierze poświęcony jest on odpowiedzi adaptatywnej niż odpowiedzi wrodzonej i nie jest wiążący do ekstrapolacji tego fenomenu w układzie ludzkim. W układzie myszy (samic DBA/j z samcem szczepu DBA/2J) obserwuje się wyższy odsetek płodów resorbowanych w stosunku do mysiej ciąży prawidłowej przez co uważany on jest za model ciąży zagrożonej poronieniem (z przyczyn immunologicznych), często przyrównywanej do spontanicznych poronień u człowieka. Czy rzeczywiście zależy to od ważącej aktywności limfocytów B (w tym subpopulacji limfocytów Breg) pozostaje nadal niejasne. Nawiasem mówiąc w dysertacji tylko w jednym miejscu znalazłem bardzo zdawkowe wzmianki o roli komórek NK, a na pewno brak ich interakcji odczuwa się w prowadzonej dyskusji. W moim odczuciu komórki NK mają o wiele większe znaczenie w utrzymaniu ciąży niż komórki Breg. Zresztą świadczą o tym stosunki ilościowe w doczesnej, ponieważ komórki B stanowią w doczesnej tylko ok. 2% wszystkich limfocytów, a ich odsetek w trakcie ciąży wzrasta jedynie do 3%, zaś w macicy (u myszy) od ok 8,5 dnia ciąży (jakby koniec I trymestru w ciąży u człowieka) mają już tendencję spadkową. W tzw. organach obwodowych nie widać też specjalnej mobilizacji w zakresie populacji limfocytów B, (śledziona, węzły chłonne) ponieważ przyjmują one raczej charakter stały. Może jedynym wyjątkiem są węzły drenujące macicę, jednak świadczy to jedynie o reakcji na odczyn zapalny, nie zaś o wyraźnej ich roli jako regulatora ciąży. Z kolei dla samej ciekawości lekarza (którym jestem) wynikałoby może więcej prześledzenie w powyższej (podjętej przez doktorantkę sytuacji modelowej) sekrecji przeciwciał asymetrycznych (inaczej zwanych blokującymi), które z powodu przyłączenia się grupy oligosacharydowej do jednej z domen fragmentu Fab (czyli części wiążącej antygen immunoglobuliny), powodując niezdolność do tworzenia reakcji z antygenem, a przez co nie aktywują one układu dopełniacza czy fagocytozy – obu podstawowych funkcji mediowanych przez przeciwciała. Piszę o tym dlatego, że we frakcji kobiet objawiających spontaniczne poronienia i nakładające się (z partnerem) haplotypy antygenów układu HLA owo wzmocnienie przeciwciał blokujących pozostaje nadal jako skuteczna interwencja w odróceniu niekorzystnego losu ciąży. Być może więc biorąc pod uwagę złożoność procesu ciąży i jej ewentualnej ochrony, znajdzie się miejsce dla niektórych przypadków nawracających poronień (na tle immunologicznym) także miejsce dla limfocytów Breg, ponieważ liczba procesów kierunkujących czy ochraniających ciążę jest olbrzymia i skutkuje powstaniem także zbytecznych ramion reakcji (tzw. redundancy), które charakteryzują się włączaniem w określonych sytuacjach zagrożenia, nie zaś jako systemowe reakcje

obligatoryjne. Tak też należałoby czytać, moim zdaniem, wyniki, które uzyskała doktorantka w modelu myszy CBA/JxDBA/2J, ponieważ jest to model, który jasno wskazuje na większą rolę dla limfocytów Treg niż B reg (z czego wynika zastosowanie, wlewu intralipidowego, zwłaszcza promowanego przez naukowo-badawcze grupy kanadyjskie, m.in. Dawid Clark). I znów mamy tutaj potwierdzenie hipotezy poprzez prowadzone z sukcesem strategie terapeutyczne. Nie mamy wystarczających potwierdzeń terapeutycznych dla ramienia oddziałującego przez komórki Breg (najwyżej są to dowody pośrednie), to wiąże się jednak z faktem, że niedookreślony fenotyp limfocytów Breg nie pozwala na precyzyjne monitorowanie ich zachowania. Wszystko to nie oznacza, że jestem nieprzychylnie nastawiony do hipotez, które usiłuje udowodnić doktorantka. Przeciwnie, jej wysiłek w grupie badawczej, którą reprezentuje jest widoczny. Zwłaszcza dotyczy to wcześniej opublikowanych prac – na przykład zaświadczających o produkcji IL-35 przez subpopulację Breg w endometriozie (przy czym nie czytałem tej pracy zatem zapytuje doktorantkę czy podzielono subpopulacje kobiet z endometriozą i niepłodnością wobec objawiających endometriozę bez niepłodności – i czy wtedy produkcja IL-35 w jakikolwiek sposób się zmieniała?) Jakkolwiek by tego nie rozumieć, uważam też, że opublikowana w *AJRI* z udziałem doktorantki praca (2019) prawdopodobnie używa część wyników przedstawionych w obecnej dysertacji w zakresie ekspresji cząsteczek kostymulujących limfocytów B w śledzionie (model myszy roniących). Ponieważ doktorantka jest pierwszym autorem tego doniesienia – nie wnoszę przeto w tym miejscu żadnych zastrzeżeń, a wręcz przeciwnie!

Ustosunkowując się bardziej szczegółowo do treści zawartych w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej pragnę odnieść się nieco bardziej krytycznie do niektórych jej wątków czy też formalnej strony edytorskiej rozprawy.

W spisie treści proponowałbym nie używać sformułowania materiał w stosunku do próbki biologicznej – to jest stwierdzenie żargonowe, natomiast w badaniach zwykle mówimy próbki czy są to próbki krwi czy tkanki, czy bardziej specyficznie określone („izolacja komórek z materiału zwierzęcego” – to po prostu nie brzmi dobrze. Tłumaczenia skrótów winny przejść przez drobiazgową ocenę – po pierwsze najpierw powinno nastąpić rozwinięcie angielskie skrótu, a dopiero za nim tłumaczenie polskie, wtedy uniknęłoby się „powrotu do skrótu oryginalnego, albowiem duża część z nich ma złą polską składnię, co powoduje znaczące błędy w tłumaczeniu danego hasła.

W całym wstępie, który ogólnie uważam za dobrze napisany brakuje mi szerszego spojrzenia na hipotezę całej dysertacji, jeśli odnieść się do hipotezy Wegmanna (nadal obowiązującej) brakuje schematu, w którym momencie immunodewiacja wg Wegmanna dopełniona jest rolą komórek Breg? (w wyniku aktywacji TLR9?) i gdzie są komórki NK w całym obiegu utrzymania ciąży (bo wydaje się, że na pewno to nie Breg odpowiedzialne jest za tworzenie lakun.. w wyniku rzutu hipoksyjnego) i czy wobec tego progesteron odgrywa rolę w aktywacji komórek Breg (lub które z wymienionych subpopulacji – fenotypów Breg mają receptor na progesteron?), bo pomimo naszego zamiłowania do immunologii to hormony zawiadują reakcjami immunologicznymi w trakcie ciąży, to znaczy są wobec nich nadrzędne....

Teraz mniejsze sprawy – w moich czasach „allogeniczne” pisało się przez dwa „ll”, a nie przez jedno. Określenie pół-allogeniczne, nie kupuję... jest piękne wyrażenie semi-allogeniczne, które powinno być, moim zdaniem, tu zastosowane. We wczesnej ciąży (str 14) nie mamy do czynienia z klasyczną reakcją zapalną – to jest raczej reakcja „pseudozapalna” i kontrolowana, o ile nie przekształci się w reakcję patologiczną. „Receptory immunologiczne dla antygenów” str. 16) – to wyrażenie raczej nieszczęśliwe jak dla mnie. Nie mówi się przeciwciąta „chimeryczne” tylko „chimerowe”, nie mówi się „kompartyment” tylko „kompartment”. Czy udowodniono selektywne działanie Rytuksymabu na limfocyty B?, a spośród nich na jakie subpopulacje limfocytów B on oddziałuje?? (str. 20). Nie powinno być tytułów pod tabelami, zwykle tytuły umieszczane są nad tabelami, a pod tabelami przedstawiamy tłumaczenia skrótów, których tu niejednokrotnie brakuje. Poza tym Wstęp napisany jest ze swadą, widać, że dla doktorantki

świat limfocytów B nie jest „obcy”, być może czasami zbyt onnipotentny, ale jest kwestią czasu i perspektywy bardziej zdystansowane spojrzenie, na zespół czynników immunologicznych, bardzo często odgrywających rolę „rezerwowych” dla drużyny z pierwszymi numerami, tzn. nie wszystko daje się wytłumaczyć nie wychodząc poza obręb limfocyta B...jakkolwiek tę część dysertacji czyta się całkiem dobrze...

W Materiałach i Metodach mam kilka uwag, a właściwie jedną zasadniczą – doktorantka usiłuje dokonać porównania 2 modeli, które są niekompatybilne. Myszy badane są albo w okresie bardzo wczesnym albo pod koniec (jakby przyrównać do ludzkich) 2-giego trymestru (skoro ciążę myszy przyjmujemy na 21 dni), natomiast próbki ludzkie są kolekcjonowane z I trymestru ze spontanicznymi poronieniami, aczkolwiek model myszy to raczej model dla nawykowego ronienia, podczas gdy model ludzki jest wyraźnie przypadkowy i spontaniczny. W moim rozumieniu oba modele nie przystają do siebie. Druga uwaga dotyczy inhibitora/antagonisty dla TLR9. Ponieważ jest on krytyczny dla dalszego ciągu obserwacji zawartych w dysertacji doktorantka winna dogłębnie wyjaśnić jakimi badaniami się kierowała potwierdzającymi specyficzność antagonisty. Czy mamy wierzyć na słowo doświadczeniom innych grup? Tego w pracach promocyjnych powinno się raczej unikać...

Mam jeszcze pytanie do podrozdziału 3.8. Immunofenotypowanie limfocytów. Wynika z ciągu opisowego, że w pierwszym rzędzie przygotowywano komórki do badania zewnątrzkomórkowego, a następnie poprzez permeabilizację do barwienia antygenów wewnątrzkomórkowych. Czy przeprowadzano taki ciąg doświadczalny na tych samych badanych próbkach komórek, gdy była taka potrzeba...?

Wyniki. Wyniki z reguły podawane są jasno i dydaktycznie. Nie widzę potrzeby podziału dokumentacji na Ryciny i Wykresy. Dla mnie one wszystkie po prostu są rycinami.

Analizując model myszy – kamieniem milowym całej pracy jest zastosowanie antagonisty receptora TLR9 i wykazanie, że w 14 dniu ciąży w krzyżówkach myszy o ciąży zagrożonej zaobserwowano znaczący odsetek resorbowanych płodów. Teraz jak to się miało w stosunku do zmian ekspresji czynników ko-stymulujących (na limfocytach B i T) i/lub zmian w ich wartościach odsetkowych (frekwencji). Z badań wynika, że podanie antagonisty receptorowego (ODN 2088) nie wpłynęło na ekspresję CD80 na śledzionowych limfocytów B, jednak obniżyło znacząco ekspresję ko-stymulatora w 3 dniu ciąży, w limfocytach B węzłów chłonnych. W przypadku zaś ko-stymulatora CD86 zaobserwowano wzrost ekspresji (w 3 dniu ciąży) w limfocytach B węzłów chłonnych. Z tego wynika mało koherentna obserwacja dla ekspresji ko-stymulatorów na limfocytach B w trakcie ciąży. Analiza cząsteczki CD40 nie wykazała żadnych zmian ekspresji, zaś w 3 dniu ciąży (na przekór w ewentualnych zmianach w ekspresji cząstek ko-stymulujących) nie wykazano zmian w ekspresji TLR9, jednak zaobserwowano spadek jego ekspresji w 14 dniu ciąży (zarówno w śledzionie jak i węzłach chłonnych). Widoczny brak paralelizmu obserwowanych zmian jest istotną interpretacyjną trudnością dla doktorantki w dyskusji. Badając frekwencję limfocytów B z ekspresją CD80 zaobserwowano spadek ich frekwencji w limfocytach śledzionowych (14 dzień ciąży), co nie koreluje ze spadkiem ekspresji tego ko-stymulatora (węzły chłonne), natomiast nie zaobserwowano żadnych różnic we frekwencji limfocytów B (śledziona i węzły chłonne) z ekspresją CD86, CD40, MHC klasy II w obu badanych dniach ciąży. W 14 dniu ciąży zaobserwowano spadek frekwencji limfocytów B z ekspresją TLR (śledziona i węzły chłonne). Podobnie, w 14 dniu ciąży zaobserwowano niższą ekspresję TLR na limfocytach B (po podaniu antagonisty receptora) w doczesnej. Jako reprezentanta fenotypowego dla komórek Breg wybrano populację CD19+CD5+CD1d^{high} (szkoda, że dla analogicznych badań u roniących kobiet nie wybrano dla porównania tego samego fenotypu) – przy czym analiza tej populacji w śledzionie i drenujących macicę węzłach chłonnych nie wykazała żadnych różnic pomiędzy grupą kontrolną, a grupą otrzymującą antagonistę ODN 2088. Tak samo nie wykazano istotnych różnic w ekspresji IL-10 oraz IL-6 w obu badanych grupach, co moim zdaniem w dużej mierze kwestionuje faktyczny udział

limfocytów Breg per se w wywoływaniu tolerancji immunologicznej dla utrzymania ciąży. I to tyle z zakresu obserwacyjnego limfocytów B w ciąży, w modelu mysim.

Teraz zajmiemy się limfocytami T. Zaobserwowano spadek ekspresji cząstki ko-stymulującej CD28 oraz zmniejszenie frekwencji limfocytów T CD3+CD4+CD28+ wśród limfocytów T sledzony w grupie myszy, którym podano antagonistę receptora TLR 9 (14 dzień ciąży). Jednak dla limfocytów T w drenujących okolicznych węzłach chłonnych nie potwierdzono istotnych zmian dla ekspresji cząsteczki CD28 ??!! Nie zaobserwowano też istotnych zmian dla cząsteczki CTLA4+ w obu badanych dniach ciąży (z antagonistą ODN 2088) jak i w obu badanych kompartmentach (śledziona, węzły chłonne), jak również nie zaobserwowano zmniejszenia frekwencji komórek CTLA-4+CD3+CD4+. Zaobserwowano jednak obniżoną ekspresję cząstek liganda CD40L w dniu 3 ciąży (ku naszemu zdziwieniu jednak nie w dniu 14-tym) na limfocytach T pochodzących z węzłów chłonnych (podawano antagonistę receptora TLR9). Jednak frekwencja limfocytów T z ekspresją cząsteczki CD40L nie uległa obniżeniu.

Reasumując, model myszy nie przyniósł rewelacyjnych wyników – większość obserwowanych zmian w cząstkach ko-stymulujących (moim zdaniem zarówno po stronie limfocytów B jak i T) jest kapryśna, zmienna i niekoherentna z zachowaniem analogicznych populacji limfocytów występujących w krytycznych kompartmentach limfoidalnych. Większość tych różnic wykrywana jest w dniu 14 ciąży, co wymaga mediatorów pośrednich pomiędzy oddziaływaniem na receptor TLR9 (na wczesnym etapie ciąży) a finalnymi stwierdzanymi dość niekoherentnymi zmianami na późnym etapie ciąży. Jednak obraz obserwacji nie przybliżył nas do rozwiązania tego problemu. Można oczywiście dyskutować o obniżeniu odsetka limfocytów T (w obu kompartmentach), tzw. CD4+CD25+ (po podaniu antagonisty TLR9) oraz podobnej populacji charakteryzującej się dodatkowo ekspresją FoxP3 – jednak czy potrzebują one w tym celu akurat Breg – to to jest osobna sprawa. Ponadto ekspresja IL-10 (lub właściwie jej brak) również nie wskazała na stosowną aktywność tych komórek w ciąży, ale może akurat w tym przypadku był to błąd pomiarowy??

Bardziej interesująca sytuacja zarysowała się w badaniu kobiet o ciąży prawidłowej lub ze spontanicznym poronieniem w obrębie I-szego trymestru. Badania dotyczą konsekwentnie ekspresji cząsteczek ko-stymulujących jak i subpopulacji umownie zwanymi Breg o fenotypie przejściowym CD19+CD38^{high}CD24^{high} oraz pamięci CD19+CD24^{high}CD27 (mBreg). W tym znaczeniu we krwi obwodowej u kobiet po poronieniu zaobserwowano znamienne wyższy (wśród limfocytów B) odsetek komórek Breg przejściowych (porównanie z kobietami o ciąży fizjologicznej) przy braku różnic we frekwencji komórek Breg pamięci. Limfocyty B krwi obwodowej u kobiet z poronieniami charakteryzowały się niższą ekspresją CD86 a wyższą CD40 w porównaniu do kobiet z ciążą fizjologiczną, przy braku różnic w ekspresji dla CD80, HLA-DR i TLR9. W przejściowych limfocytach Breg u kobiet z poronieniami zaobserwowano także niższą ekspresję cząsteczek CD86 a wyższą dla CD40 i HLA-DR, przy braku różnic dla ekspresji CD80 i TLR9. Konsekwentnie dla komórek Breg pamięci odnotowano niższą ekspresję cząsteczek CD86 i wyższą dla CD40 (kobiety z poronieniami) przy braku różnic w ekspresji dla cząsteczek CD80, HLA-DR oraz TLR9. Co jest interesujące wykazano u kobiet z poronieniami (prawdopodobnie kompensacyjny) większy przyrost ekspresji w komórkach przejściowych Breg i limfocytach B dla interleukiny 10 oraz wyższy poziom IL-6 w limfocytach B oraz limfocytach Breg pamięci u kobiet z ciążą prawidłową (czego akurat nie rozumiem). Odwrotnie do modelu mysiego u kobiet z poronieniami zaobserwowano wyższą ekspresję cząsteczek CTLA-4 (na limfocytach T) oraz CD40L. (Nie było różnic w ekspresji CD28 na limfocytach T). Limfocyty T krwi obwodowej od pacjentek po poronieniu charakteryzowały się wyższą frekwencją aktywowanych limfocytów T CD3+CD4+CD25+, natomiast ani odsetek komórek Treg ani ekspresja IL-10 w limfocytach Treg nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Reasumując w badaniach porównawczych rysują się obserwacje co najmniej bardziej koherentne zarówno dla ekspresji cząsteczek ko-stymulacyjnych wyrażające się w niższej

ekspresji cząsteczek CD86 a wyższej dla CD40 (u kobiet z poronieniami), a także wzrost odsetka Breg o charakterze przejściowym przy obniżeniu odsetka limfocytów T o fenotypie CD3+CD4+CD25+ - co jest interesującym scenariuszem świadczącym o aktywnej roli tych komórek w ciąży. Brak znaczących różnic w ekspresji TLR9 na limfocytach B dla obu badanych grup kobiet jest według mnie dalszym elementem wątpliwości co do pryncypialnej roli tego układu w aspekcie utrzymania ciąży lub w opisywanych interakcjach komórkowych (Breg:Treg). Być może jest to tzw. „trzeci” układ sygnalizacyjny, który zaznacza doktorantka.

Dyskusja. W podsumowaniu rozprawy widziałbym dyskusję (aczkolwiek jest ona obszerna i logiczna) z większej perspektywy. Wraca tu usytuowanie podjętych badań wobec obowiązującej hipotezy immunodewiacji Wegmana. W tym także cytokin immunotroficznych, komórek NK oraz przeciwciał blokujących. Podobnie zbudowany Wstęp dałby szersze spojrzenie i syntetyczny przegląd obowiązujących poglądów na immunologiczne uwarunkowanie ciąży. Wczesne ustalenie tolerancji na ciążę (str 92) nie zależy w mojej opinii od Breg i adaptatywnej odpowiedzi immunologicznej, a raczej odpowiedzi wrodzonej (wystarczy przeglądnąć listę cytokin z wczesnego etapu przebiegu ciąży). Na stronie nr 93 pisze się dużo o cytokinach sterujących – IL-6, IL-10, ale nie zostały one potwierdzone w cyklu obserwacyjnym (co jest dziwne dla układu myszy roniących i badanych w nich subpopulacjach Treg, Breg), zaś sprzeczność w aktywacji matrycowego RNA wobec jego ekspresji produktu białkowego (dosyć uparcie powtarzana przez doktorantkę) nie jest dowodem na żadną hipotezę, jedynie świadczy o modyfikacjach potranslacyjnych i blokowaniu wewnątrzkomórkowym, a zatem „odłożeniu” bezpośredniej potrzeby na reakcję efektorową. Nie zgadzam się też z tezami na str 95, albowiem ukrwienie łożyska zależy od hipoksji, która daje sygnał komórkom NK do nacieku naczyń i otworzenia lakun. Jest to dosyć dobrze udokumentowana hipoteza i raczej nie ma tu dużo przestrzeni dla roli receptora TLR9. Na str. 96 wraaca pytanie o specyfikę blokowania przez antagonistę ODN2088. O ile blokowanie TLR9 w okresie przedimplantacyjnym rzutuje na efekt oglądany pod koniec 2-giego trymestru – to jest tylko nieudokumentowana hipoteza (ekspresja kostymulatorów w modelu myszy z ciążą zagrożoną). Brak różnic w ekspresji pomiędzy interleukinami 6 i 10 u myszy z ciążą zagrożoną wobec kontrolnych – utrudnia wytlumaczenie obserwowanego fenomenu (str. 101). I na koniec garść pozytywów – zbiorcze tabelki ułatwiają czytanie dyskusji, która jednak jest mało krytyczna wobec uzyskanych wyników własnych, które nie zawsze są spójne (zarysowałem ten fakt w podrozdziale dotyczącym wyników). Podobają mi się za to wnioski, które są trzeźwym spojrzeniem wobec mnogości wyprodukowanych wyników, które nie dają się jednolicie zinterpretować. Oczywiście jedna dysertacja problemu nie rozwiąże. Szanuję nakład pracy i nowatorstwo interpretacyjne i wierę w swoje wyniki.

Właśnie nowatorstwo podjętych badań pozwala mi wierzyć w realny postęp kariery doktorantki i entuzjazm, który przebija z całej dysertacji. Podjęcie tego trudnego tematu pozostaje niepodważalne i jestem przekonany, że skierowana do mojej oceny dysertacja mgr Darii Lorek pt. „Udział receptora TLR9 limfocytów B w regulacji tolerancji immunologicznej w ciąży” spełnia warunki określone a art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawa o szkolnictwie Wyższym i nauce, przeto wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Darii Lorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Poznań 7.10. 2024 rok

Maciej Kurpisz

