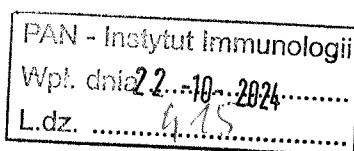


Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; 601 342 781
jacek.malejczyk@wum.edu.pl



OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR DARIŁ LOREK PT. „UDZIAŁ RECEPTORA TLR9 LIMFOCYTÓW B W REGULACJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ W CIĄŻY.”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Pani mgr Darii Lorek została przygotowana w postaci 142 stronicowej monografii w języku polskim. Pracę wykonano w Laboratorium Immunologii Rozrodu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Prof. dr hab. Anny Chełmońskiej-Soyty. Promotorem pomocniczym była dr inż. Anna Sławek. Laboratorium Immunologii Rozrodu jest jednym z wiodących ośrodków prowadzących nowoczesne badania w dziedzinie immunologii rozrodu i badania mgr Lorek doskonale wpisują się w tę tematykę. Chciałbym również podkreślić, że badania wykonywane w ramach realizacji tej pracy były finansowane z grantu Preludium 14 Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem była mgr Daria Lorek.

Układ odpornościowy odgrywa kapitalną rolę w regulacji procesów rozrodczych u ssaków. Uczestniczy on nie tylko w tworzeniu łożyska, ale również w kontroli prawidłowego przebiegu ciąży, w szczególności tworzeniu specyficznego stanu tolerancji w stosunku do rozwijającego się allogenicznego zarodka i płodu. Mechanizmy tego zjawiska są przedmiotem badań od wielu lat. Wydaje się, że zasadnicze elementy tych mechanizmów zostały poznane, jednak w dalszym ciągu istnieje wiele niewiadomych, które muszą być wyjaśnione. Ma to szczególne znaczenie w kontekście wielu stanów patologicznych takich jak niepłodność, a w szczególności zaburzenia receptywności endometrium, spontaniczne nawracające poronienia lub preeklampsja. Uważam więc, że podjęcie przez Doktorantkę zupełnie nowego i ciekawego wątku związanego z aktywnością i potencjalną rolą supresorowych limfocytów B i receptorów TLR9 było całkowicie uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr Darii Lorek ma układ typowy dla tego typu monografii. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, listę skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis tabel i rycin oraz bibliografię.

Streszczenie w języku angielskim i polskim w zwięzły sposób opisuje przesłanki podjęcia badań, cel pracy, uzyskane wyniki oraz ich podsumowanie.

Wstęp zaczyna się zwięzłym, ale jednocześnie wyczerpującym wprowadzeniem omawiającym zmiany adaptacyjne układu odpornościowego w przebiegu ciąży. Następnie Doktorantka szczegółowo opisuje limfocyty B oraz mechanizmy ich aktywacji i prezentacji antygeny limfocytom Th. W dalszej części znajdujemy opis zmian zachodzących w populacji limfocytów B i ich potencjalnej roli w zjawiskach fizjologicznych i patologicznych w przebiegu ciąży. Znaczenie limfocytów B nie ogranicza się wyłącznie do produkcji przeciwciał, dlatego kolejny podrozdział wstępu Doktorantka poświęciła regulatorowym limfocytom B (Breg), w szczególności ich powstawaniu, fenotypowi, roli w regulacji odpowiedzi odpornościowej ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnej roli w ciąży. Ponieważ tematyka rozprawy jest poświęcona roli receptora TLR9, kolejne strony wstępu zostały poświęcone charakterystyce tej cząsteczki, jej roli w limfocytach B oraz aktywacji w przebiegu ciąży.

Podsumowując, wstęp został napisany oparciu o najnowszą wiedzę w sposób zwięzły i zrozumiały nawet dla osób nie zajmujących się na co dzień podobną tematyką badawczą. Na uwagę zasługuje również uzupełnienie tekstu pisanego dwoma tabelami podsumowującymi badane subpopulacje limfocytów B u ludzi i myszy oraz bardzo dobrą kolorową ryciną przedstawiającą szlak sygnalizacji za pośrednictwem TLR9. Informacje zawarte we wstępie są bardzo dobrym wprowadzeniem do tematu badań i stanowią logiczne uzasadnienie celu pracy Doktorantki.

Przedstawiony przez mgr Darię Lorek cel pracy jest dość złożony. Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy Doktorantka zadała kilka pytań, które podsumowała w ogólnym celu pracy. Celem tym było zbadanie udziału receptora TLR9 w kształtowaniu fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B i regulacji tolerancji immunologicznej we wczesnej ciąży u kobiet i mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem. Realizacja wyżej sformułowanego ogólnego celu pracy miała być zrealizowana poprzez wykonanie badań w ramach trzech celów szczegółowych:

1. Ocena wpływu podaży agonisty TLR9 we wczesnej ciąży w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem na powodzenie ciąży, fenotyp kostymulacyjny limfocytów B, ekspansję komórek Breg oraz ekspresję na limfocytach B ligandów cząsteczek kostymulacyjnych limfocytów T.
2. Określenie ekspresji TLR9, cząsteczek kostymulacyjnych i HLA-DR w wybranych subpopulacjach limfocytów B z krwi obwodowej kobiet w pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.
3. Określenie ekspresji ligandów cząsteczek kostymulacyjnych limfocytów T we krwi kobiet w pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.

Uważam, że wyżej wymienione cele zostały sformułowane prawidłowo i stanowią logiczny ciąg mający doprowadzić do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania.

W Materiałach i metodach Doktorantka wyczerpująco opisała wszystkie mysie i ludzkie tkanki, których użyto w pracy, sposób ich pobierania i przygotowania do dalszych badań oraz procedury eksperymentalne. Należy zaznaczyć, że prowadzenie badań zostało pozytywnie zaopiniowane przez lokalną komisję etyczną i bioetyczną. Ponadto zebrała w tabelach i dokładnie

opisała wszystkie odczynniki i przeciwciała użyte w pracy, Wymieniła też, łącznie ze składem wszystkie bufory i media oraz aparaturę wykorzystaną w badaniach. Opis zwierząt doświadczalnych i wykonywanych doświadczeń nie budzi wątpliwości, tym bardziej że został doskonale zilustrowany na kolorowym schemacie. Chciałbym przy tym zaznaczyć, że mgr Lorek opanowała trudną sztukę oceny cyklu rujowego myszy i wszystkie pozostałe elementy pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi w tym preparację narządów, ocenę płodów i izolację komórek z narządów rozrodczych myszy. Doktorantka podała szczegółowe informacje kliniczne o pacjentkach włączonych do badań, a ich dane demograficzne i kliniczne podsumowała w tabeli. Badania na materiale ludzkim były prowadzone na komórkach izolowanych z krwi obwodowej.

Komórki były dodawane stymulacji w warunkach hodowli komórkowych, co dokładnie opisano w tekście podając jednocześnie w formie tabelarycznej skład używanej w doświadczeniach pożywki. Z tego opisu jak również z opisu immunofenotypowania komórek wynika, że te same metody stosowano w stosunku do komórek mysich i ludzkich. Niestety opis ten jest na tyle lakoniczny, że trudno ocenić, czy wszystkie rodzaje analizowanych komórek pochodziły i od myszy i od badanych kobiet.

Moją uwagę skupił opis immunofenotypowania komórek i analizy cytofotometrycznej. Został on przedstawiony bardzo szczegółowo i poprawnie. Analiza cytofotometryczna jest bardzo trudną sztuką i jej właściwe przeprowadzenie jest kluczowe dla uzyskanych wyników. Muszę przyznać, że Doktorantka bardzo dobrze przedstawiła i zilustrowała stosownymi rycinami zawierającymi wykresy punktowe i histogramy strategię bramkowania dla wszystkich badanych populacji komórkowych. Strategia ta jest przekonująca i nie budzi najmniejszych zastrzeżeń.

Podobnie nie mam zastrzeżeń do zastosowanych w pracy metod analizy statystycznej.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Lorek zostały szczegółowo opisane w rozdziale „Wyniki”. Uzyskane wyniki zostały wyczerpująco opisane i bogato zilustrowane na wykresach. O ogromnym zakresie badań jakie wykonała Doktorantka świadczy fakt, że było ich aż 23, a każdy składał się z co najmniej kilku oddzielnych wykresów. Całość sprawia bardzo dobre wrażenie, a wyniki pomimo złożoności przedstawianych porównań przedstawione zostały jasno i zrozumiale. Na szczególną pochwałę zasługuje przedstawienie wyników w formie punktowej, co pozwala czytelnikowi zorientować się w ich rozkładzie i rozrzucie i w pewien sposób potwierdza wyniki analizy statystycznej.

Dyskusja uzyskanych wyników jest bardzo obszerna i zajęła aż 20 stron manuskryptu. Jest to spowodowane bardzo dużą liczbą uzyskanych danych. Przyznam, że mgr Daria Lorek bardzo dobrze poradziła sobie z tym wyzwaniem, a na uznanie zasługuje podsumowanie zmian ekspresji badanych cząsteczek w różnych populacjach komórek zebrane w kilku czytelnych tabelach. Doktorantka wykazała się umiejętnością analizy własnych wyników w kontekście doniesień innych badaczy oraz umiejętnością korzystania z piśmiennictwa naukowego. Dodam też, że piśmiennictwo zostało starannie dobrane i jest właściwie cytowane.

Moja jedyna uwagę krytyczna to umieszczenie na pierwszych stronach dyskusji rodzaju wprowadzenia, które w większości jest ewidentnie powtórzeniem informacji zawartych we wstępie. Ta część zajęła aż 4 strony i z powodzeniem mogłaby być usunięta.

Na podstawie uzyskanych wyników mgr Daria Lorek sformułowała 4 wnioski:

1. Zablockowanie sygnalizacji TLR9 u samic szczepu CBA/J krytych samcami szczepu DBA/2J zwiększa prawdopodobieństwo utraty allogenicznej ciąży, natomiast prawdopodobnie nie decyduje o skutecznej implantacji.
2. W mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem zahamowanie stymulacji TLR9 powodując zmiany w fenotypie kostymulacyjny limfocytów T i B i prowadzi do obniżenia puli limfocytów Treg i aktywowanych limfocytów Th o fenotypie CD3+CD4+CD25+, natomiast nie wpływa na frekwencję limfocytów Breg.
3. TLR9 nie jest bezpośrednio zaangażowany w kształtowanie fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B u kobiet po spontanicznym poronieniu.
4. U kobiet w następstwie poronienia spontanicznego wzrost frekwencji limfocytów B o fenotypie tolerogennym w powiązaniu z obniżoną frekwencją aktywowanych limfocytów T sugeruje ich zaangażowanie w przywracaniu równowagi immunologicznej zakłóconej poronieniem.

Przedstawione wnioski wynikają z wcześniej sformułowanych celów, co świadczy, że Doktorantka zrealizowała założenia pracy. Mam jednak pewne uwagi, a w zasadzie pytania do Doktorantki, na które oczekuję odpowiedzi w trakcie publicznej obrony rozprawy.

1. Nie do końca zrozumiałem sformułowania zawarte w pierwszym wniosku. Co w tym kontekście oznacza termin „skuteczna implantacja” i jak on się ma do „zwiększenia prawdopodobieństwa utraty allogenicznej ciąży”?
2. W drugim wniosku doszło chyba do popełnienia błędu gramatycznego i w związku z tym nie jestem pewien, czy Doktorantce chodziło o to, że „... stymulacja TLR9 powoduje zmiany ... i prowadzi do obniżenia puli limfocytów ...”, czy „... stymulacja TLR9 powodując zmiany ... prowadzi do obniżenia puli limfocytów ...”.
3. Wydaje mi się, że 4 wniosek nie jest wystarczająco poparty uzyskanymi wynikami i jest jedynie próbą wyjaśnienia skąd inąd zaskakującego wyniku wskazującego na wzrost częstości tolerogennych limfocytów B u kobiet, u których doszło do spontanicznego poronienia.

Na zakończenie chciałbym stwierdzić, że jako całość, monografia sprawia bardzo dobre wrażenie. Praca została napisana ładną polszczyzną i została bardzo starannie przygotowana od strony redakcyjnej. Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem wytknąć Doktorantce kilka nieistotnych błędów lub niezręcznych sformułowań. Jednym z nich jest używanie słowa „immunologiczny” w nieprawidłowym kontekście. Immunologia to nazwa nauki zajmująca się odpornością. Wiem, że termin „odpowiedź immunologiczna”, chociaż niewłaściwy, jest szeroko stosowany i być może trzeba się z tym pogodzić. Nie pogodzę się jednak z terminem „środowisko immunologiczne.” Czyżby autorka miała na myśli np. swoje koleżanki i kolegów z Instytutu?

Chciałbym też zwrócić uwagę, że termin „antygeny płodowe” w naukach medycznych ma inne znaczenie niż to do którego odnosi się Doktorantka. W tym kontekście należało użyć sformułowania „antygeny płodu”. Nie podoba mi się również używane przez Doktorantkę słowo

„frekwencja”, które jest kalką z angielskiego i powinno być raczej zastąpione słowem „częstość” lub „odsetek.”

Muszę również zwrócić uwagę Doktorantce, że zgodnie z przyjętymi zasadami tytuły tabel powinny znajdować się nad tabelą. Natomiast wszelkie dodatkowe informacje umieszcza się pod tabelą. Ponadto, o ile w opisie wykresów ilustrujących wyniki doświadczeń na myszach mgr Lorek uwzględniła liczbę badanych zwierząt, informacji tej zabrakło mi na wykresach przedstawiających wyniki analizy komórek od pacjentek. Doktorantka nie ustrzegła się też niewielkich błędów typograficznych, których ze względu na ich niewielkie znaczenie nie będę wymieniał.

Powyższe uwagi nie mają wpływu na moją ogólną, wysoką ocenę rozprawy. Na podstawie przedstawionej mi dysertacji mogę stwierdzić, że Doktorantka dysponuje bardzo dobrym i zaawansowanym warsztatem badawczym, posiada szeroką wiedzę i bardzo dobrze orientuje się w tematyce badań nad immunologicznymi aspektami rozrodu, zna światowe piśmiennictwo w tej dziedzinie oraz potrafi krytycznie analizować wyniki badań naukowych. Tym samym mogę bez wątpliwości wyrazić przekonanie, że osiągnęła ona stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniającej ją do ubiegania się o stopień doktora.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Darii Lorek spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne określone w art. 187 ust. 1-4. ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2023. poz. 742 z późniejszymi zmianami). Doktorantka wykazała się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na bardzo nowoczesnej metodologii badań doświadczalnych. Na uwagę zasługuje też fakt, że jej dysertacja została oparta na bardzo złożonych i skomplikowanych badaniach na materiale zwierzęcym i klinicznym, co wskazuje na ogromny trud i zaangażowanie Doktorantki w uzyskanie wyników.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Darii Lorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 **PODPIS ZAUFANY**
JACEK
MALEJCZYK
21.10.2024 23:41:30 (GMT+2)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Warszawa, 21/10/2024

Jacek Malejczyk