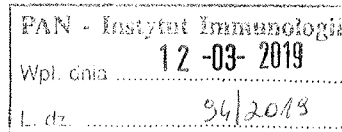




UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii



Prof. dr hab. Nadzieja Drela

Instytut Zoologii, Zakład Immunologii

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Tel: 22 5541126

Warszawa, 08.03.2019

### Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marka Bogacza pt.

#### **„Opóźnione odrzucenie allogenicznego przeszczepu wysepek trzustkowych u myszy NOD z cukrzycą indukowaną streptozotocyną”**

Rozprawa doktorska wykonana w Center for Biotechnology and Genomic Medicine of Medical College of Georgia at Augusta University, Augusta, Georgia, Stany Zjednoczone Ameryki

Promotor:

dr hab. Małgorzata Cebrat, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Promotor pomocniczy:

Dr Rafał Pacholczyk, Center for Biotechnology and Genomic Medicine of Medical College of Georgia, Augusta University, Augusta, USA

Cukrzyca typu 1 (T1D), dotyczy najczęściej dzieci i osób młodych poniżej 20 roku życia (85-90%). Może także wystąpić u osób starszych, powyżej 30 roku życia, jednakże zachorowalność na cukrzycę typu 1 w tej grupie wiekowej jest o wiele mniejsza (10-15%).

Aktualnie, mimo lepszego zrozumienia mechanizmów tolerancji immunologicznej, nadal niewiele wiadomo o czynnikach uczestniczących w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Pierwotną przyczyną ich rozwoju jest nieprawidłowa selekcja negatywna limfocytów T i B, jednak niewiele też wiadomo o przyczynach jej nieprawidłowego przebiegu, bądź specyficzności czy fenotypie limfocytów T, które nie poddają się temu procesowi w grasicy. Wyniki badań z wykorzystaniem myszy NOD, które są wyjątkowo wrażliwe na cukrzycę typu 1 wskazują na różnice specyficzności TCR autoreaktywnych limfocytów T odpowiedzialnych za rozwój choroby, przyczyny ich niewrażliwości na selekcję negatywną w grasicy, a także mechanizm ich aktywacji w środowisku trzustki. Na szeroką skalę prowadzone są badania czynników ryzyka w zależności od

płci, przynależności do określonej grupy etnicznej, wpływu środowiska, markerów genetycznych. Notowany w ostatnich latach wzrost zachorowalności na T1D w USA, Kanadzie i Europie, szczególnie w grupie dzieci poniżej 5 roku życia, stymuluje do poszukiwania nowych metod terapii.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 133 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie, Autor dysertacji wskazuje na zwiększającą się zachorowalność na cukrzycę typu 1 i na nowe propozycje leczenia, które mogłyby zastąpić najczęściej stosowaną terapię insulinową. Obiecujące wydaje się przeszczepianie pacjentom wysepek trzustkowych, mimo łatwego do przewidzenia zagrożenia, które wynika głównie z reakcji odrzucania przeszczepu, co znacznie ogranicza zakres stosowania tej terapii. W celu przezwyciężenia trudności opracowywane są nowe protokoły terapii, których celem jest indukcja długotrwałej tolerancji w przebiegu toczącej się choroby autoimmunizacyjnej, w której atak układu odpornościowego na własne antygeny skutkuje zaburzeniem metabolizmu glukozy. Niewiele wiadomo o funkcjonowaniu układu odpornościowego w warunkach różnych zaburzeń metabolicznych w ogóle, w tym również w warunkach hiperglikemii, na co wskazuje Autor dysertacji. We wstępie opisano rozwój limfocytów  $T\alpha\beta$  i mechanizmy selekcji, wśród których selekcja negatywna odpowiada za utrzymanie tolerancji dojrzałych limfocytów T na antygeny własne. Wskazano także na rolę powstających w grasicy limfocytów T regulatorowych w tolerancji, a zważywszy ich zróżnicowany repertuar TCR, zasugerowano możliwość ich udziału w tolerancji nie tylko na antygeny własne, jak wskazywały wyniki wczesnych badań, ale również w indukcji tolerancji na antygeny obce, szczególnie ważne w przeszczepianiu tkanek allogenicznych. W dalszej części Autor opisuje mechanizmy tolerancji obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem roli pochodzących z obwodowych narządów limfoidalnych limfocytów T regulatorowych. Następnie, Autor przedstawia immunopatogenezę cukrzycy typu 1 i wskazuje na opisane w literaturze naukowej przyczyny utraty tolerancji, wskazując tym samym na możliwe cele terapii, które ostatecznie i tak są trudne do zdefiniowania zważywszy sprzeczne wyniki badań w wielu kwestiach, w tym także dotyczących limfocytów T regulatorowych. Autor dysertacji wskazuje na alternatywną, w stosunku do terapii insulinowej, metodę leczenia z wykorzystaniem przeszczepu wysepek trzustkowych, opisuje historię jej stosowania, procedurę samego sposobu dokonywania przeszczepu i przedstawia możliwe mechanizmy odrzucania przeszczepów. Następnie, Autor wprowadza w możliwości badania cukrzycy typu 1 z wykorzystaniem modeli zwierzęcych i kończy wstęp opisem problemu badawczego, uzasadnia wybór modelu, przedstawia cel pracy i wyszczególnia kolejne zadania badawcze. Materiały i metody wykorzystywane w badaniach opisane są w sposób przejrzysty, starannie dopasowane do założonych celów. Zastosowano różnorodne i nowoczesne techniki

badawcze, wprowadzono oryginalne modyfikacje standardowych modeli badawczych z wykorzystaniem szczepów myszy transgenicznych.

Zważywszy niedostatki terapii insulinowej, niepowodzenia transplantacji allogenicznych wysepek trzustkowych i niewystarczające wyniki badań wpływu hiperglikemii na komórki odporności nabytej, a także inspirujące wyniki badań wskazujące na przedłużenie przeżycia przeszczepu w zależności od czasu jego wykonania po indukcji hiperglikemii, Autor pracy postanowił zbadać mechanizmy odpowiedzialne za tę zaskakującą zależność koncentrując uwagę na równowadze między limfocytami T efektorowymi i regulatorowymi. W tym celu wykorzystał podstawowy układ doświadczalny indukcji hiperglikemii za pomocą streptozotocyny u myszy normalnych, bez cukrzycy (C57BL/6) i myszy NOD wrażliwych na spontaniczną indukcję cukrzycy typu 1, zakładając że epizody hiperglikemii mogą mieć odmienne skutki w zależności od podłoża genetycznego sprzyjającego rozwojowi choroby. Zadania badawcze charakteryzuje precyzyjny plan prowadzący ostatecznie do założonego celu, którym było określenie: a/ wpływu hiperglikemii indukowanej STZ na reakcję odrzucania przeszczepu allogenicznych wysepek trzustkowych u myszy NOD, b/ mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany ilościowe i funkcjonalne limfocytów T w środowisku hiperglikemicznym indukowanym STZ u myszy NOD i C57BL/6, c/ repertuaru TCR i specyficzności różnych typów limfocytów T powstających wskutek homeostatycznej ekspansji po indukcji hiperglikemii streptozotocyną, d/ udziału samej streptozotocyny i ostrej hiperglikemii na badane procesy, e/ mechanizmu indukcji ograniczonej czasowo tolerancji występującej po epizodzie hiperglikemii indukowanej STZ. Eksperymenty wykonane w ramach poszczególnych zadań badawczych i uzyskane wskutek ich realizacji wyniki opisane zostały po mistrzowsku w rozdziale Wyniki. Ten rozdział stanowi najobszerniejszą część dysertacji obejmującą 37 stron z 28 rycinami i 3 tabelami. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo dobra graficzna prezentacja wyników poprzedzona niejednokrotnie prostym schematem przeprowadzonego eksperymentu.

Autor wprowadza w kolejne etapy badań, począwszy od standaryzacji układu doświadczalnego przez ustalenie optymalnej dawki STZ, najbardziej korzystnej metody izolacji wysepek trzustkowych, techniki ich przeszczepienia biorcy i monitorowania skuteczności przeszczepu w utrzymaniu prawidłowego stężenia glukozy. Dopelnieniem wstępnego etapu badań, potwierdzającego właściwy wybór modelu i słuszność założeń, było wykazanie, że wykonanie przeszczepu syngenicznego w 9 dniu po indukcji hiperglikemii przywraca prawidłowe stężenie glukozy już następnego dnia po przeszczepie i skutkuje utrzymaniem takiego stanu przez kolejne miesiące. Podjęcie biologicznej funkcji przez przeszczep dokumentuje dodatkowo przez jego usunięcie, co powoduje nawrót ostrej hiperglikemii. I już od tego momentu, kolejne podrozdziały Wyników wzbudzają coraz większe zainteresowanie, za sprawą samych wyników, inspirującą

logiką eksperymentów, które umożliwiły ich uzyskanie oraz sposobu ich przedstawiania poprzedzanego za każdym razem krótkim wprowadzeniem celu poszczególnych doświadczeń. Pan Marek Bogacz wykazał rzadko spotykany styl pisania w sposób jasny, zwięzły i krytyczny.

Wracając do uzyskanych przez Autora pracy, wyników, nasywa się szereg pytań inspirowanych przez wnikliwość samego Autora, a nie niedostatek wyników Jego badań.

Ostra hiperglikemia skutkuje zmniejszeniem liczby komórek w grasicy i węzłach chłonnych, przy czym zmiany są większe u myszy NOD, co wskazuje na rolę podłoża genetycznego. Podobnie jest w przypadku zmian składu odsetkowego głównych populacji tymocytów. Obraz zmian jaki widzimy na rycinie 15 sugeruje blok w rozwoju tymocytów ze stadium DN do DP charakterystyczny również w przypadku zwiększonego poziomu glukokortykoidów, czy podawania ich syntetycznych odpowiedników. Autor jednak sugeruje zwiększoną wrażliwość tymocytów DP na hiperglikemię, która skutkuje zmniejszeniem ich odsetka. Czy faktycznie jest to potwierdzona sugestia, czy tylko jedna z możliwych?

Jak słusznie zauważa Autor pracy, tolerancja w znacznej mierze zależy od równowagi między limfocytami T efektorowymi i regulatorowymi mierzonej stosunkiem liczbowym. Autor sugeruje odmienny wpływ hiperglikemii na limfocyty T efektorowe i Treg. Dlaczego pominięto analizę limfocytów Treg w grasicy w populacji tymocytów SP CD4+? Wyniki wielu badań wskazują na związek między zmniejszeniem odsetka tymocytów DP i zwiększeniem odsetka tTreg w populacji SP CD4+. Odsetek limfocytów tTreg ulega zwiększeniu w infekcjach bakteryjnych, pasożytniczych, podczas procesów fizjologicznych jak ciąża czy starzenie. Podobnie, ulega zwiększeniu proporcja tTreg:Tef. W środowisku limfopenicznym zwiększa się potencjał proliferacyjny limfocytów Treg, co wskazują wyniki badań Autora dysertacji. Dlaczego i tym razem pominięto grasicę, która jest centralnym narządem limfoidalnym tworzącym środowisko rozwoju limfocytów T, wyjątkowo wrażliwym na wszelkie czynniki wywierające wpływ na układ odpornościowy, a ponadto odpowiedzialnym za rozwój tolerancji na antygeny własne?

Plan eksperymentów, uzasadnienie ich wykonania i interpretacja uzyskanych wyników, czyni styl pracy pana Marka Bogacza podobnym do perfekcyjnie prowadzonego śledztwa. Autor dysertacji stosuje zasadę, że do weryfikacji hipotezy jeden dowód nie jest wystarczający. Posłużyć się przykładem zasługującej na uznanie metodyki badań pana Marka Bogacza. W węzłach chłonnych i śledzenie myszy NOD, po 9 dniach od wstrzyknięcia STZ, wykazano zwiększenie odsetka Ki67 pozytywnych limfocytów Treg, co wskazuje na ich aktywną proliferację. Jednakże, dla Autora pracy nie jest to wystarczający dowód na rolę homeostatycznej ekspansji limfocytów T w środowisku limfopenicznym (STZ wpływa na zmniejszenie liczby komórek w narządach limfoidalnych). Wykorzystuje On metodę adoptywnego transferu splenocytów do naturalnie

limfopenicznych myszy NOD.scid i wykazuje większy potencjał proliferacyjny limfocytów Treg w środowisku limfopenicznym, a przy okazji eksperyment dostarcza informacji o podobnym potencjale limfocytów do ekspansji niezależnie od pochodzenia od dawcy hiperglikemicznego czy z poziomem cukru w granicach normy. A skoro tak, to Autor bada czy hiperglikemia wpływa na zmianę repertuaru TCR limfocytów Tef i Treg z wykorzystaniem myszy NOD.TCR<sup>mini</sup> w porównaniu z warunkami normoglikemii przwróconej za pomocą pompy insulinowej, konkludując, że takiego wpływu nie wykazał. W pracy zastosowano bardzo ciekawy, oryginalny model analizy specyficzności odpowiedzi na alloantygeny wykorzystany do badania udziału ekspansji homeostatycznej występującej wskutek indukcji hiperglikemii przez streptozotocynę na specyficzność TCR limfocytów T efektorowych i regulatorowych. Wyniki tych badań doprowadziły do konkluzji, że klony TCR allospecyficznych limfocytów Treg nie wykazywały różnic między myszami normo- i hiperglikemicznymi i nie pokrywały się z repertuarem allospecyficznych limfocytów Tef, co wyklucza możliwość indukcji tolerancji poprzez konwersję alloreaktywnych limfocytów T efektorowych do Treg. Zatem, jaka jest sugestia Autora dysertacji dotycząca powstawania allospecyficznych limfocytów Treg?

Kolejną, oryginalną modyfikację modelu adoptywnego transferu zastosowano do badania wpływu hiperglikemii indukowanej STZ na homeostatyczną ekspansję limfocytów T: limfopeniczny biorca otrzymywał jednocześnie komórki od pokrewnego dawcy normo- i hiperglikemicznego. Taka modyfikacja wykluczyła zmienność między poszczególnymi eksperymentami oraz, co jest także ważne w badaniach z wykorzystaniem zwierząt, ograniczyła ich liczbę.

Ostatnia seria eksperymentów, bardzo ważna przy formułowaniu końcowych wniosków, dotyczyła roli samej streptozotocyny. W tym celu, skutek wstrzyknięcia STZ był eliminowany przez podawanie egzogennej insuliny. Ta część badań, podobnie jak poprzednie, dotyczyła wielu wątków: wpływu STZ na odrzucanie przeszczepu, odsetek limfocytów Treg w krwi, indukcję apoptozy tymocytów i limfocytów obwodowych narządów limfoidalnych.

Ważną i dojrzałą częścią pracy jest przeprowadzona na 11 stronach dyskusja wyników zakończona podsumowaniem w formie wniosków. Dyskusja podzielona jest na sekcje odnoszące się do najważniejszych wyników własnych w tle wyników badań innych autorów (około 300 pozycji piśmiennictwa). Jej treść jest skondensowana, a Autor dysertacji unika wnioskowania zbyt odległego od przedstawionych wyników. Ostatnia część dysertacji, Konkluzje, również zaskakuje zwięzłością, która wynika z krytycznej analizy wyników i niechęci do wyciągania zbyt daleko idących wniosków, co jest bardzo dużą zaletą badacza.

Proponowana terapia cukrzycy typu 1 z wykorzystaniem przeszczepu wysepek trzustkowych może budzić wątpliwości. Komórki  $\beta$  trzustki mogą pełnić funkcję komórek prezentujących antygen, stąd jedną z proponowanych terapii jest również ich usunięcie. Jakie jest zatem szersze podłoże teoretyczne terapeutycznego zastosowania przeszczepu wysepek trzustkowych, poza ich zdolnością do syntezy insuliny?

Mimo, iż cukrzyca typu 1 uważana jest za chorobę zależną od aktywacji limfocytów T, to jednak przypisuje się rolę w jej rozwoju limfocytom B poprzez syntezę autoprzeciwciał, prezentacji antygenów i syntezę cytokin prozapalnych, stąd proponowane metody terapii poprzez delecję limfocytów B (zastosowanie Rituximabu w terapii). Dlaczego ta terapia nie przyniosła spodziewanych rezultatów? Czy brak sukcesu, czyni limfocyty B nieprzydatnymi jako cel terapii cukrzycy typu 1?

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem pana Marka Bogacza. Według mojej oceny spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dlatego składam do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie mgr Marka Bogacza do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej „Opóźnione odrzucenie allogenicznym przeszczepów wysepek trzustkowych u myszy NOD z cukrzycą indukowaną streptozotocyną”.

Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana Marka Bogacza stosowną nagrodą ze względu na oryginalność zastosowanych schematów badań, wnikliwą analizę i krytyczne podejście do uzyskanych wyników oraz merytoryczną, zwięzłą dyskusję. Ponadto, na szczególne uznanie zasługuję styl pisania, jasne formułowanie tez i wniosków, a także rzadka cecha pisania wyłącznie zdań zawierających informację naukową. Wnikliwość i rzetelność naukowa Autora dysertacji widoczna jest na każdym etapie badań i dyskusji wyników.

