

Warszawa, 11.10.2018

Prof. Włodzimierz Maśliński  
Zakład Patofizjologii i Immunologii  
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji  
Spartańska 1  
02-637 Warszawa

### Ocena

Rozprawy Doktorskiej magister Justyny Agier zatytułowanej:  
„Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w regulacji fenotypu i aktywności mastocytów”

Mastocyty (komórki tuczne) uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych wpływających na homeostazę organizmu. Oprócz tych ważnych funkcji, w ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje, że komórki te aktywnie uczestniczą w obronie przeciwko patogenom. Bardzo duża liczba mastocytów, ich dystrybucja w organizmie w miejscach najbardziej narażonych na kontakt z patogenami oraz zdolności do szybkiej reakcji na stymulację poprzez syntezę i uwalnianie wielu mediatorów zapalenia czyni z nich istotny element układu odpornościowego. W rozpoznaniu patogenów kluczową rolę odgrywają receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (patogen associated molecular patterns, PAMPs), oraz rozpoznające sygnały zagrożenia (danger associated molecular pattern, DAMPs) przekazywane przez cząsteczki pochodzące z uszkodzonych komórek gospodarza. Pomimo kluczowej roli tych receptorów w inicjacji szybkiej i efektywnej odpowiedzi na zagrożenie, większość informacji o tych receptorach, zmianie ich ekspresji i funkcjonowaniu pochodzi z badań prowadzonych na makrofagach i neutrofilach, choć ich ekspresja jest wykazywana na wielu typach komórek układu immunologicznego. Badania dotyczące tych receptorów na komórkach tucznych są stosunkowo nieliczne i większości były prowadzone na liniach komórkowych. Jeszcze mniej wiemy o potencjalnym udziale naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych takich jak katelicydyny i defensyny w modulacji zdolności mastocytów do rozpoznania i funkcjonowania dojrzałych mastocytów. Zainspirowana tak niewielkim stanem wiedzy na ten temat Autorka przedstawiła hipotezę, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe: katelicydyna LL-37 i defensyna hBD-2, wpływają na fenotyp i funkcje dojrzałych mastocytów, co może zwiększać właściwości przeciwdrobnoustrojowe tych komórek. Obecna rozprawa miała na celu weryfikację tej hipotezy.

Praca jest przygotowana w nietypowym układzie, na który składa się krótkie wprowadzenie, określenie celu pracy, metodyki badań, omówienie wyników, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, i wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy. Załączone są również kopie 5 prac, w tym 3 prac oryginalnych oraz 2 prac poglądowych. Prace te były opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym wyróżnionych współczynnikiem oddziaływania (Impact Factor, IF), który sumarycznie wynosi IF=11,876. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem.

We wprowadzeniu Autorka pokrótce przedstawiła istotną rolę, jaką odgrywają peptydy przeciwdrobnoustrojowe: katelicydyny i defensyny w obronie przeciwko bakteriom,

wirusom oraz grzybom. Oprócz bezpośredniego działania niszczącego te drobnoustroje, i hamującego syntezę ich DNA, RNA, białek i składników ściany komórkowej, peptydy te wpływają na komórki układu immunologicznego służąc jako chemoatraktanty oraz poprzez indukcję syntezy i wydzielania wielu mediatorów zapalenia oraz czynników o właściwościach immunoregulacyjnych.

W kolejnej części, Autorka omówiła komórki tuczne, zaznaczając ich rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, ale także udział w procesach patologicznych. Następnie wskazała, że coraz więcej danych wskazuje, że komórki te obecne w dużych ilościach w skórze, pod nabłonkiem wyścielającym drogi oddechowe, przewód pokarmowy i drogi moczowo-płciowe, w tkankach w sąsiedztwie naczyń krwionośnych i limfatycznych, mają ułatwiony dostęp do patogenów wnikających do organizmu. Co więcej, komórki te posiadają zdolności do syntezy mediatorów zapalenia, z których część jest magazynowana w ziarnistościach, gotowa do wydzielania w bardzo krótkim czasie po aktywacji.

Następnie, Autorka omówiła mechanizmy umożliwiające szybkie i specyficzne rozpoznanie drobnoustrojów przez wyspecjalizowane receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (PAMP, patogen associated molecular patterns) lub cząsteczki uwalniane z uszkodzonych lub zagrożonych komórek gospodarza (DAMP, damage associated molecular patterns). Poznano kilka typów tych receptorów w tym rodziny TLR (Toll like receptors), CLR (C-type lectin receptors), NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), RLR (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors). Chociaż ekspresja tych receptorów na wielu subpopulacjach leukocytów jest stosunkowo dobrze poznana, ich ekspresja przez komórki tuczne nie jest dobrze udokumentowana, i dotyczy przede wszystkim linii komórkowych lub komórkach niedojrzałych.

To krótkie wprowadzenie, jest bardzo profesjonalnie rozszerzone w dwóch załączonych pracach poglądowych: „Katelicydyny i defensyny w regulacji aktywności przeciwdrobnoustrojowej komórek tucznych” opublikowanej w czasopiśmie Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, oraz „An overview of mast cell patterns recognition receptors” opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie Inflammation Research”

Wszystkie trzy części stanowią znakomite wprowadzenie do przedstawienia celu badania, którym było ustalenie czy:

- katelicydyna LL-37 i defensyna hBD-2 regulują ekspresję błonowych i wewnątrzkomórkowych cząsteczek cząsteczek receptorów rozpoznających wzorce molekularne z grupy TLR, NLR i RLR.
- katelicydyna LL-37 i defensyna hBD-2 aktywują mastocyty do odpowiedzi prozapalnej i migracji.

W następnej części Metodyce badań Autorka opisała uzyskanie materiału do badań, którym były natywne, w pełni dojrzałe komórki tuczne izolowane z zawiesiny komórek jamy otrzewnowej szczurów rasy Wistar poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Percollu. Do stymulacji mastocytów używano komercyjnie dostępne peptydy przeciwdrobnoustrojowe – katelicydynę LL-37 i defensynę hBD-2. Na przeprowadzenie doświadczeń z wykorzystaniem szczurów uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi.

W komórkach tych oceniano:

1. konstytutywną oraz indukowaną peptydami LL-37 i hBD-2 ekspresję receptorów TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9), receptorów NLR (NOD1, NOD2), oraz RLR (RIG-1) z wykorzystaniem techniki qRT-PCR,
2. konstytutywną oraz indukowaną peptydami LL-37 i hBD-2 ekspresję białka cząsteczek

TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, NOD1, NOD2, RIG-1 z wykorzystaniem technik Western blot, cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej,

3. syntezę i uwalnianie leukotrienów cysteinyłowych (cysLT) oraz chemokin CCL2 i CCL3 pod wpływem peptydów LL-37 i hBD-2 metodą immunoenzymatyczną ELISA,

4. degranulację i uwalnianie histaminy pod wpływem peptydów LL-37 i hBD-2 metodą spektrofotometryczną,

5. wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) pod wpływem peptydów LL-37 i hBD-2 metodą mikroskopii konfokalnej,

6. migrację badanych komórek indukowaną peptydami LL-37 i BD-2 z wykorzystaniem komory Boydena.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem odpowiednich testów. Szczegółowe opisy zastosowanych metod oraz testów statystycznych zostały przedstawione w opublikowanych artykułach oryginalnych.

W kolejnej części Autorka przedstawiła omówienie wyników, spośród których za najważniejsze uważam, wykazanie, że dojrzałe komórki tuczne szczura:

- wykazują konstytutywną ekspresję transkryptów TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9,
- wykazują konstytutywną ekspresję białka TLR2, TLR4, TLR5 na powierzchni, a TLR3, TLR7, TLR9 wewnątrzkomórkowo,
- wykazują ekspresję TLR2, TLR4, TLR5 w błonie komórkowej, a TLR3, TLR7 i TLR9 wewnątrzkomórkowo, chociaż część TLR2 i TLR5 występuje też w obszarze okołojądrowym,
- wykazują ekspresję NOD1, NOD2 i RIG-1 zarówno na poziomie mRNA jak i białka wewnątrzkomórkowo,
- pod wpływem stymulacji peptydem LL-37 zwiększają powierzchniową ekspresję TLR2 i TLR4 i TLR9, oraz wewnątrzkomórkową TLR5, TLR7 i TLR9,
- pod wpływem stymulacji LL-37 i hBD-2 zwiększają wewnątrzkomórkową ekspresję receptorów NOD1, NOD2 i RIG-1. Dodatkowo, następuje translokacja receptora NOD2 z okolicy retikulum endoplazmatycznego pod błonę komórkową,
- pod wpływem stymulacji LL-37 i hBD2 syntezują i wydzielają chemokiny CCL2 i CCL3,
- pod wpływem hBD2, lecz nie LL-37, syntezują i wydzielają leukotrienocysteinyłowe (CysLT),
- pod wpływem LL-37 i hBD2 ulegają degranulacji i uwalniają histaminę,
- pod wpływem LL-37 i hBD generują reaktywne formy tlenu,
- pod wpływem LL-37 i hBD2 zwiększają migrację.

W kolejnej części, Autorka przedstawia wnioski, które dobrze odzwierciedlają otrzymane wyniki. W szczególności Autorka podkreśla konstytutywną obecność receptorów TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR-7 TLR9), NLR (NOD1, NOD2) oraz RLT (RIG-1) w dojrzałych natywnych komórkach tucznych, których ekspresja zwiększa się w przypadku większości receptorów pod wpływem stymulacji peptydami LL-37 i hBD2. Takie zmiany mogą powodować potęgowanie zdolności tych komórek do rozpoznawania i wiązania cząsteczek PAMP oraz DAMP. Co więcej, peptydy te stymulują aktywację komórek tucznych do produkcji i wydzielania mediatorów zapalnych w tym ROS, a także indukują ich migrację.

Wyniki te upoważniają Autorkę do sformułowania wniosku końcowego, że katelicydyna i defensyna hBD2 w różny sposób wzmacniają przeciwdrobnoustrojową aktywność mastocytów i amplifikują ich udział w mechanizmach skierowanych przeciwko patogenom.

Po zapoznaniu się z opublikowanymi pracami Autorki, recenzent w pełni się zgadza z tymi wnioskami.

Przedstawione w opublikowanych pracach dyskusje są napisane profesjonalnie. Autorka szczegółowo omawia otrzymane wyniki z danymi literaturowymi, w większości dotyczącymi linii komórkowych. Autorka wykazuje się dużą znajomością literatury i zdolnością do przedstawiania swojego zdania w oparciu o uzyskane wyniki.

Całość rozprawy, jako cyklu prac, oceniam wysoko. Praca rozszerza naszą wiedzę na temat możliwości modulującego wpływu katelicydyny i defensyny na komórki tuczne a otrzymane wyniki mają charakter nowatorski. Warto podkreślić, że prace zawarte w przedstawionym cyklu prac były już recenzowane przez przynajmniej dwóch recenzentów z różnych czasopism. Potencjalne uwagi dotyczące wyboru doświadczeń i ich wykonania, jeżeli jakieś były, zostały uwzględnione przed ich publikacjami.

Biorąc pod uwagę powyższe, mam przyjemność stwierdzić, że praca odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim określonym w art. 13.ust 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki, i dlatego przedstawiam Pani Dziekan i Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie magister Justyny Agier do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na nowatorski charakter otrzymanych wyników badań oraz opublikowanie wyników prac w czasopismach o zasięgu międzynarodowym wyróżnionych współczynnikami oddziaływania IF, zgłaszam wniosek o jej wyróżnienie.

Warszawa, 11.10.2018

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

KIEROWNIK  
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII  
Narodowy Instytut Geriatrii,  
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie



prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński