

Olsztyn, 30.07.2020 r.

Prof. dr hab. n. med.  
Marcin Mycko  
Kierownik  
Kliniki Neurologii  
Collegium Medicum  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora  
magister Pauliny Kowalczyk  
„Wpływ otyłości indukowanej dietą wysokotłuszczową na reakcję nadwrażliwości  
kontaktowej mediowanej przez komórki NK u myszy”**

Jako recenzent Rozprawy na Stopień Naukowy Doktora, autorstwa magister Pauliny Kowalczyk, wykonanej w Katedrze Biologii Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, której promotorem jest Profesor dr hab. Marian Szczepanik, pragnę podkreślić śmiałość i wagę tematu podjętego przez Doktorantkę.

Poznanie roli mikrobiomu jelitowego jako regulatora funkcji układu immunologicznego stanowi jedno z ważniejszych odkryć ostatniej dekady. Wykorzystanie nowoczesnych technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania umożliwiło pokazanie różnorodności i złożoności flory jelitowej w niedostępny do tej spory sposób. Dopiero zaczynamy rozumieć, jak mikrokosmos organizmów jelitowych oraz ich produktów wpływa na funkcjonowanie całego organizmu. Dwa kluczowe aspekty oddziaływania mikrobiomu jelitowego, które zostały dobitnie wykazane, to jego wpływ na funkcje układu odpornościowego, oraz znaczenie dla regulacji gospodarki lipidowej i rozwoju tkanki tłuszczowej. Wszystkie te zjawiska są podejmowane w rozprawie magister Pauliny Kowalczyk. Z przyjemnością stwierdzam, iż przedstawiona mi Rozprawa jest świetnym przykładem, w jaki sposób nowoczesny naukowiec może połączyć te tak ważne obecnie zagadnienia, czyli rozwój reakcji immunologicznej, stan mikrobiomu jelitowego oraz rolę diety, tkanki tłuszczowej i otyłości. Doktorantka w swoim projekcie wykazała unikalną zdolność do syntezy różnych metod badawczych, od zaawansowanych modeli analizy immunologicznej, złożonych badań molekularnych oraz technik oceny stanu gospodarki lipidowej. Mogę śmiało zaliczyć mgr Kowalczyk do ekskluzywnego grona naukowców zdolnych do połączenia i translacji tak szerokiego typu metod badawczych i danych eksperymentalnych. Dlatego szczególnie wysoko oceniam przedstawione w niniejszej Pracy Doktorskiej badania jako przykład unikalnego i bardzo interdyscyplinarnego podejścia. Taki profil badań bardzo dobrze wpisuje się w tradycję projektów prowadzonych w zespole Profesora Mariana Szczepanika, wiodącej pod względem jakości i złożoności prowadzonych przez siebie badań immunologicznych polskiej grupy badawczej.

Rozprawa obejmuje łącznie 108 stron tekstu i podzielona została na 6 głównych rozdziałów: Wstęp, Cel pracy i problemy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Rozprawa zawiera 3 tabele, oraz 23 ryciny zawierające wyniki oryginalne. Tekst obejmuje też 2 schematy ułatwiające zrozumienie przebiegu doświadczeń. Tabele, ryciny i schematy zostały przedstawione bezpośrednio przy odpowiadającym im tekście Rozprawy. Taki sposób organizacji znacznie ułatwia interpretację przedstawionych wyników. Piśmiennictwo obejmuje 270 pozycji, w przeważającej części prac oryginalnych i, za wyjątkiem 1 pozycji, anglojęzycznych. Referencje ułożone zostały według kolejności pojawiania się ich w tekście. Cytowane publikacje są trafnie dobrane, co było niełatwe, bo literatura dotycząca mikrobiomu i jego wpływu na funkcjonowanie układu odpornościowego jest bardzo rozległa. Wymienione pozycje piśmiennicze są trafne i prezentują obecny stan wiedzy, co dowodzi, iż Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w aktualnej literaturze dotyczącej tematu Rozprawy.

Wstęp Rozprawy dobrze ilustruje wagę badań nad mechanizmami regulującymi rozwój reakcji nadwrażliwości kontaktowej, oraz szczególnej roli jaką mogą odgrywać w tym zakresie komórki NK. Doktorantka przedstawia również wyniki dotychczasowych badania nad dietą, otyłością i mikrobiomem jako potencjalnymi regulatorami funkcji limfocytów NK. Nie mam żadnych wątpliwości, iż Doktorantka świetnie orientuje się w tych zagadnieniach. Mechanizmy reakcji nadwrażliwości kontaktowej od przynajmniej kilkunastu lat są przedmiotem intensywnych badań Katedry Biologii Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem Prof. Szczepanika i przyniosły szereg bardzo znaczących odkryć, oraz wybitnych publikacji. Ciągłe jednak, celem pełnego zrozumienia wszystkich aspektów rozwoju nadwrażliwości kontaktowej, konieczne są dalsze prace, które pozwolą poznawać złożone mechanizmy tej reakcji i regulujące je uwarunkowania. Doktorantka jest w pełni świadoma tego faktu i bardzo dobrze przedstawia zarówno uznane modele działania badanych przez siebie reakcji, jak i nowe dane, znacząco poszerzające ten obraz. Cały Wstęp ma przejrzysty i logiczny układ, stanowiąc bardzo udane wprowadzenie do dalszych części rozprawy.

Założenia i cele pracy są ambitne, adekwatne do aktualnego stanu wiedzy i stanowią bardzo logiczną konsekwencję wcześniejszych odkryć zespołu Prof. Szczepanika. W rozdziale „Materiały i metody” Autorka zawarła opis wybranego modelu badawczego, uzyskanych próbek do badań, metodyki przeprowadzonych eksperymentów, oraz listę i protokoły szerokiego spektrum metod wykorzystanych celem uzyskania i analizy danych. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż wykorzystane metody zostały opisane bardzo dokładnie, z dbałością o szczegóły i niuanse techniczne, co dowodzi znakomitego warsztatu Doktorantki. Analiza statystyczna została przeprowadzona rzetelnie i adekwatnie do założeń badania.

Kolejny rozdział, Wyniki, obejmuje opis rezultatów przeprowadzonych analiz. Doktorantka uzyskała bardzo szeroki zakres danych uzyskanych w przeprowadzonych doświadczeniach nad rolą limfocytów NK w rozwoju nadwrażliwości kontaktowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje dobór modelu badawczego, tj. przeprowadzenie analiz z wykorzystaniem myszy

Rag1<sup>-/-</sup>. Myszy te są genetycznie pozbawione limfocytów T i B. W ten sposób wykorzystany został świetny model dla badania pozostałych komórek biorących udział w rozwoju nadwrażliwości kontaktowej, w tym przede wszystkim limfocytów NK. Autorka umiejętnie posłużyła się całym panelem badań i eksperymentów celem wykazania roli diety, otyłości oraz mikrobiomu jako regulatorów funkcji limfocytów NK oraz przebiegu nadwrażliwości kontaktowej.

Mam następujące pytania odnośnie rozdziału „Wyniki”:

1. Doktorantka pokazuje nasilenie reakcji nadwrażliwości kontaktowej u myszy Rag1<sup>-/-</sup> poddanych diecie wysokotłuszczowej, np. w zakresie obrzęku uszu czy zwiększeniu przepuszczalności naczyń, w porównaniu do myszy na diecie kontrolnej. Zauważalne jest jednak, iż sama dieta wysokotłuszczowa prowadzi do znaczącego nasilenia tych samych parametrów, nawet bez wywoływania reakcji nadwrażliwości kontaktowej (np. Ryc. 4.1B, czy Ryc. 4.3). Czy względne nasilenie reakcji nadwrażliwości kontaktowej, tzn. ponad przyrosty parametrów spowodowane przez samą dietę wysokotłuszczową, nadal jest statystycznie większe niż analogiczne zmiany u myszy Rag1<sup>-/-</sup> na diecie kontrolnej?
2. Statystyczne nasilenie parametrów reakcji nadwrażliwości kontaktowej u myszy Rag1<sup>-/-</sup> poddanych diecie wysokotłuszczowej w porównaniu do myszy na diecie kontrolnej były obecne po 8 tygodniach diety, nie były zaś po 4 tygodniach diety. Gdyby myszy Rag1<sup>-/-</sup> były poddane diecie wysokotłuszczowej przez 4 tygodnie, a następnie przez 4 tygodnie przywrócona byłaby dieta normalna, to czy reakcja nadwrażliwości kontaktowej byłaby u takich myszy statystycznie silniejsza niż u myszy będących przez całe 8 tygodni jedynie na diecie kontrolnej?

W rozdziale Dyskusja Autorka przeprowadziła analizę uzyskanych wyników. Na szczególne wyróżnienie zasługuje swoboda Doktorantki w omawianiu wyników, pomimo rozległego zakresu przeprowadzonych doświadczeń i imponującej liczby uzyskanych wyników. Opisanie przez Autorkę nasilenie zjawiska nadwrażliwości kontaktowej u myszy Rag1<sup>-/-</sup> w wyniku otyłości indukowanej dietą, w mechanizmie zależnym od wątrobowych limfocytów NK to nowe i nieznane dotąd zjawisko. Nie mam wątpliwości, iż recenzowana Rozprawa ma charakter nowatorski i stanowi istotny wkład w reprezentowaną dziedzinę nauki, a zidentyfikowanie mechanizmów modulacji reakcji nadwrażliwości kontaktowej stanowią istotne i znaczące odkrycie.

Rozdział poświęcony Wnioskom jest rzetelnym odzwierciedleniem uzyskanych wyników w kontekście założeń pracy. Wydzielenie Wykazu wybranych skrótów, oraz spis schematów, rycin i tabel ułatwiają orientację w tekście. Na wyróżnienie zasługuje schludność, klarowność i estetyka całej Rozprawy. Niestety, Doktorantka nie ustrzegła się dość licznych literówek, obecnych nawet we Wnioskach i w Streszczeniu. Na szczęście te drobne niedociągnięcia nie wpływają na zrozumienie tekstu. Przedstawiona praca ukazuje talent Autorki nie tylko w zakresie pracy naukowej i laboratoryjnej, ale także jako autora umiającego przejrzysto przekazać tematykę i wyniki swoich trudnych i rozległych badań.

W podsumowaniu recenzji mam przyjemność stwierdzić, iż rozprawa magister Pauliny Kowalczyk spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora i stawiam wniosek o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie tej Pracy Doktorskiej.

***Z poważaniem***

Kierownik Kliniki Neurologii

*prof. dr hab. n. med. [Marcin Mycko](#)*