UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej

prof. dr hab. Marek Jutel

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Wąsik

pt.: „Badania mysiego modelu nadwrażliwości typu późnego na kazeinę z próbą antygenowo-swoistej immunosupresji"

Praca doktorska została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami. We wstępie w sposób bardzo szczegółowy opisano mechanizmy nadwrażliwości oraz mechanizmy tolerancji immunologicznej, ze szczegółowym uwzględnieniem alergii na kazeinę mleka krowiego. Jednak mechanizmy tolerancji typu IV powinny zawierać nowocześniejsze podejście z uwzględnieniem roli subpopulacji limfocytów np. TH 17. Podobnie w mechanizmach tolerancji brakuje dokładniejszego opisu populacji limfocytów regulatorowych Treg np. wg *Sözener Z Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2020; 20(6):591-601.*

Autorka skoncentrowała się na stworzeniu syntetycznego, ale wnikliwego obrazu sposobu komunikacji międzykomórkowej przy pomocy egzosomów i ich nowopoznanej roli przekazywania i transportowania sygnału regulacyjnego w postaci mikroRNA (miRNA).
Cel pracy został wyraźnie przedstawiony i zrealizowany przy zastosowaniu metod badawczych prawidłowo dobranych. Nadwrażliwość kontaktowa (contact hypersensitivity - CHS) jest jedną z form odpowiedzi typu komórkowego (późnego) (delayed-type hypersensitivity - DTH), w której komórką wykonawczą są limfocyty T. W warunkach eksperymentalnych wywołuje się ją np. u myszy poprzez naskórną aplikację haptenu (np.TNP lub oksazolonu), a po okresie kilku dni można wywołać fazę efektorową CHS, podając hapten na skórę ucha, co powoduje zaczerwienienie małżowiny usznej i jej obrzęk, który można ocenić np. przez pomiar grubości ucha. Mechanizmy indukcji, ekspresji i

ul. Chałubińskiego 5 50-368 Wrocław
T: +48 71 784 17 40 F: +48 71 784 04 17 agnieszka.czerniawska@umed.wroc.pl www.umed.wroc.pl

regulacji CHS są podobne lub identyczne jak w innych formach DTH (np. jak w niektórych postaciach autoimmunizacji, odrzucaniu przeszczepu, w odpowiedzi na pewne zakażenia), stąd też ze względu na łatwość jej wywołania i pomiaru jest szeroko stosowanym modelem doświadczalnym nad ogólnymi mechanizmami odpowiedzi typu późnego i jej regulacji. W przedstawionej rozprawie doktorskiej opracowano nowy model śródskórnej immunizacji antygenem kazeiny (Cas) w celu wywołania mysiego modelu DTH na białko mleka krowiego. Ustalono fenotyp komórek efektorowych, które należą do populacji makrofagów oraz limfocytów CD4+. Kolejnym etapem było wyizolowanie supresyjnych egzosomów zawierających cząsteczki miRNA-150 i produkowanych przez komórki CD8+, od myszy uprzednio poddanych procesom tolerancji za pomocą kazeiny. Na uwagę zasługuje staranność z jaką oczyszczano egzosomy i odróżniano je od innych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Egzosomy dwukrotnie ultrawirowano, jak również oczyszczano na kolumnach chromatograficznych oraz potwierdzono ekspresję molekuły CD9 i CD81, a także potwierdzono obecność łańcuchów kappa. Zastosowano inhibitor antymiRNA w celu potwierdzenia roli miRNA w działaniu supresyjnym. W dwóch doświadczeniach wykazano antygenową swoistość zastosowanych egzosomów. W ostatniej części przetestowano, która droga podania egzosomów daje najlepsze rezultaty zahamowania reakcji na antygeny Cas. Okazało się, że najlepsze metody podania to naturalne drogi ekspozycji, czyli śródskórnie i do żołądka.

Opis metodyki badań jest szczegółowy, a uzyskane wyniki zostały precyzyjnie omówione i zilustrowane w 13 rycinach. Dyskusja wyników ma logiczną konstrukcję i precyzyjny styl, a jej treść świadczy o bardzo dobrej znajomości prezentowanej tematyki.

Prezentowane wyniki posiadają istotne znaczenie poznawcze i kliniczne oraz inspirują do dalszych badań. Autorka podjęła zagadnienie w niewielkim jedynie stopniu opracowane w piśmiennictwie i zastosowała w badaniach wiele nowoczesnych metod. Autorka podkreśla w zakończeniu, że zastosowanie egzosomów transportujących cząsteczki miRNA mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie diagnostyce i terapii chorób nowotworowych oraz zakaźnych.

Uwagi krytyczne:

- brak oceny fenotypu (subpopulacji) limfocytów T zarówno CD4+ (TH1, TH2, TH17 Treg?) jak i CD8+ (Tc 1, Tc2 itp.) . Nie wiadomo jaki był mechanizm supresji – Treg-zależny, Tc(REG)-zależny;
- w konsekwencji wnioski nie są do końca uzasadnione i powinny zostać przeredagowane;
- w wynikach i dyskusji doktorantka używa zwrotu „zaindukowano proces tolerancji na kazeinę", a w poprzednich rozdziałach mówi o „aktywnej supresji"; oraz „próba prowokacji" która w materiałach opisana jest jako „ponownie stymulowano zwierzęta antygenem" – wymaga to ujednolicenia;
- w opisie użytych zwierząt zabrakło doprecyzowania, czy były to samce lub samice, w jakim były wieku podczas eksperymentów oraz wyszczególnienia jaki szczep myszy był użyty w konkretnym doświadczeniu;
- doktorantka powinna podać sumaryczną liczbę myszy, które zostały wykorzystane, by z jednej strony zobrazować trud związany z realizacją niniejszej pracy;
- należy udokumentować spełnienie wymogów stawianych przez komisje bioetyczne;
- kontrola negatywna powinna być wykonana i pokazana przy każdym eksperymencie, z treści rozprawy wynika tylko, że taka została wykonana w pierwszym doświadczeniu „porównanie odpowiedzi alergicznej u myszy uczulonych z wykorzystaniem dwóch frakcji antygenu Cas" oraz w „ocena odpowiedzi zapalnej w modelu aktywnej supresji", natomiast w kolejnych doświadczeniach nie ma żadnej informacji na jej temat;

Pomimo przedstawionych uwag ogólna ocena pracy jest bardzo pozytywna. Praca ta wyróżnia się oryginalnością tematyki i sposobem wykonania co w połączeniu z wysokiej jakości dokumentacją naukową świadczy, że jej autorka jest młodym naukowcem o dużych możliwościach rozwojowych.

W związku z tą opinią zwracam się do Wysokiej Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Magdaleny Wąsik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnoszę o wyróżnienie pracy.

Wrocław, 15.08. 2021

prof. dr med. Marek Jutel

prof. dr hab. med. MAREK JUTEL
specjalista chorób wewnętrznych
alergolog
immunolog kliniczny
Wrocław, ul. Hallera 95
7717513