Prof. Włodzimierz Maśliński

Zakład Patofizjologii i Immunologii

Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji

Spartańska 1

02-637 Warszawa

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Angeliki Domagały (uprzednio Angeliki Peruń) zatytułowanej :

„The role of the CD36 and SR-A/CD204 scavenger receptors in the fight against bacterial infections" (Rola receptorów zmiataczy CD36 I SR-A/CD204 w zwalczaniu infekcji bakteryjnych").

Przedstawiona rozprawa, której najważniejsze wyniki przedstawiono poniżej, stanowi cykl 2 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR), której wartość punktacji wg MNiSW wynosi 240 punktów, co przekracza rekomendacje Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagielońskiego obowiącujące w postępowaniach o nadanie stopnia doktora. Cykl prac obejmuje:

1. A. Peruń, R. Biedroń, M.K.Konopiński, A. Białecka, J. Marcinkiewicz, S. Józefoski, „Phagocytosis of live versus killed or fluorescently labeled bacteria by macrophages differ in both magnitude and receptor specificity"
   Immunol. Cell Biol. 95 (2017) 424-435. https://doi: 10.1038/icb.2016.112
   IF=5.126, MNiSW=140
2. A. Peruń, M. Gębicka, R. Biedroń, P. Skalska, S. Józefowski, „The CD36 and SR-A/CD204 scavenger receptors fine tune Staphylocouc aureus-stimulated cytokine production in mouse macrophages. Cell Immunol.22 (2022);372:104483. doi: 101016/j.cellimm.2022.104483.
   IF= 4.868, MNiSW=100

Receptory zmiatacze (SR) wykazują szereg właściwości, z których jednymi z istotnych jest udział w odporności bakteryjnej. Wiele badań prowadzonych z użyciem zabitych lub znakowanych fluorescencyjnie bakterii wskazywało na udział receptorów SR, a szczególnie CD36 oraz klasy A (SR-A/CD204), w niezależnym od opsonin wiązaniu i fagocytozie tych bakterii. Co więcej, u myszy z usuniętymi genami kodującymi CD36 lub SR-A/CD204 obserwuje się znaczne upośledzenie odporności przeciwbakteryjnej i wykazuje się zwiększoną ich śmiertelność w infekcjach bakteryjnych. Wyniki tych badań sugerowały bezpośredni udział receptorów SR w obronie przeciwbakteryjnej. Pomimo tych danych, Autorka wskazała na możliwe, nie do końca prawidłowe interpretacje ostatnio publikowanych danych, gdyż brakowało bezpośrednich dowodów na udział tych receptorów w wiązaniu i fagocytozie żywych, nie zmodyfikowanych bakterii. Podobnie, pomimo danych wskazujących na udział receptorów SR w protekcji przeciwbakteryjnej poprzez zależną od dawki modulację produkcji cytokin pro- i przeciw zapalnych, Autorka zaproponowała cykl nowych badań mogących pogłębić naszą wiedzę na ten temat poprzez weryfikację dwóch uzupełniających się hipotez:

1. O zdolności receptorów zmiataczy (SR) do pośredniczenia w nieopsonizowanej fagocytozie żywych bakterii *Escherichia coli* (Ec) i *Staphylococus aureus* (Sa) reprezentujących bakterie gram-ujemne i gram-dodatnie, oraz ocena względnego udziału różnych SR obecnych na mysich makrofagach w tym procesie.

2. Że za zwiększoną śmiertelność myszy pozbawionych receptorów zmiataczy CD36 lub SR-A/204 w trakcie infekcji bakteryjnych w większym stopniu odpowiada stymulowana przez bakterie nadmierna produkcja cytokin prozapalnych, prowadząca do wstrząsu septycznego, niż defekt procesu fagocytozy.

stanowiących główne cele rozprawy.

Do realizacji tych celów Autorka używała myszy z usuniętymi genami kodującymi receptory zmiatacze CD36 -/-, lub SR-A/CD204-/- oraz podwójnie negatywne CD34-/- , SR-A-/-, na których udział uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej.

W badaniach Autorka stosowała dwa szczepy bakterii reprezentujących bakterie gram-ujemnych i gram-dodatnich (Escherichia coli, Ec) i Staphylococus aureus, Sa), które były wyznakowane fluorescencyjnie, zabite lub stosowane żywe, do oceny wiązania i fagocytozy

przez makrofagi izolowane z wysięku otrzewnowego badanych myszy, oraz produkcji wybranych cytokin pro- i przeciwzapalnych. Oceniano także internalizację bakterii oraz kompleksów kwasu lipotejchojowego oraz receptorów TLR2. Wewnątrzkomórkową ekspresję CD14 i TLR2 oceniano z użyciem cytometrii przepływowej. Zastosowanie tych, często złożonych metod było niezbędne do realizacji zaplanowanych badań.

Spośród bardzo wielu wyników za najważniejsze uważam wykazanie, że:

1. SR-A jest głównym receptorem zmiataczem uczestniczącym w fagocytozie fluorescencyjnie znakowanych bakterii Sa.
2. W porównaniu do fagocytozy wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym (pHr) bakterii Sa, -pHr-Sa) fagocytoza żywych bakterii jest znacznie niższa i jest prowadzona przez inne receptory.
3. Fagocytoza bakterii Ec wyznakowanych pHr-Ec jest w niewielkim stopniu prowadzona z uczestnictwem receptora SR-A.
4. Rodzaj wyznakowania bakterii wpływa na specyficzność fagocytozy bakterii.
5. Żywe, nieopsonizowane Ec, albo nie są fagocytowane, albo fagocytowane wyłącznie przez SR-A.
6. Makrofagi z wysięku otrzewnowego myszy CD36-/-, oraz w mniejszym stopniu makrofagi myszy SR-A-/- wykazują osłabioną produkcję cytokinw odpowiedzi na niskie dawki bakterii Sa.
7. Produkcja cytokin indukowana bakteriami Sa jest całkowicie mediowana przez TLR2 wewnątrzkomórkowo.
8. CD36 kieruje internalizację kompleksu CD14 z jego ligandami, w zależnej od klatryny ścieżce, która umożliwia jej ko-lokalizację z niezależnie internalizowanym TLR2 w endosomach.
9. W nieobecności CD36 i SR-A endocytoza CD14 i TLR2 jest kierowana do ścieżek niezależnych od klatryny, co prowadzi do przyspieszonej degradacji tych receptorów.
10. CD36 ma niewielką rolę w całkowitym pochłanianiu kwasu lipotejchojowego, ale jest niezbędna w jego dostarczeniu do lizosomów poprzez ścieżkę zależną od klatryny.
11. Niezależnie sygnały mediowane przez SR negatywnie regulują produkcję cytokin przez makrofagi z wysięku otrzewnowego.

Autorka przedstawiła bardzo profesjonalnie napisane dyskusje, w których odniosła się do stanu obecnej wiedzy dotyczącej przeprowadzonych badań, równocześnie wskazując pewne niedociągnięcia metodyczne opublikowanych prac, które mogły powodować ogólnie

akceptowane interpretacje mechanizmów związanych z rolą receptorów zmiataczy w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, za nie do końca uzasadnione. Przedstawione, w pracach stanowiących rozprawę doktorską, wyniki pogłębiają naszą wiedzę, a równocześnie, zdaniem recenzenta, dostarczają przekonywujących dowodów, na prawidłowość nowej interpretacji tych mechanizmów.

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa w formie dwóch publikacji oryginalnych, opublikowanych w czasopismach naukowych z wysokimi współczynnikami oddziaływania i łączną wartością punktacji MNiSW równej 240 punktów, spełnia warunki ustawowe rozpraw doktorskich. W publikacjach tych Autorka sformułowała ważne hipotezy naukowe, określiła jasne cele naukowe do ich weryfikacji, zaplanowała i wykonała doświadczenia, przedstawiła wyniki przeprowadzonych badań oraz przeprowadziła dyskusję otrzymanych wyników w kontekście dostępnej wiedzy. Publikacje te stanowią istotny wkład w pogłębienie wiedzy na temat roli badanych receptorów zmiataczy w zwalczaniu infekcji bakteryjnych oraz mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane upośledzenie odporności przeciwbakteryjnej w myszy z niedoborami tych receptorów. Z tych powodów, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie magister inżynier Angeliki Domagały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, że względu na wysoki poziom naukowy rozprawy, chciałbym przedstawić wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

Warszawa, 30.08.2022

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

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

prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński