



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

KRAKÓW, 15. 08. 2022

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
KIEROWNIK ZAKŁADU IMMUNOLOGII

PROF. DR HAB. JOANNA CICHY

Ocena pracy doktorskiej mgr Jagody Mantej

pt. „Badanie immunomodulacyjnych właściwości zewnątrzkomórkowych białek szoku termicznego w kontekście rozwoju i terapii wybranych chorób autoimmunologicznych”

Choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, w których nadmierna i destrukcyjna aktywność układu immunologicznego jest przyczyną patologii, stanowią jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Choroby te dotyczą średnio co 20-tę osobę i pomimo coraz szerszej oferty leczenia, w tym dostępu do leków nowej generacji tzw. leków biologicznych, pozostają nieuleczalne. Co więcej, wiele obecnie wykorzystywanych leków wymaga długotrwałego i często „agresywnego stosowania”, w celu niezależnego od „targetu” osłabienia układu odporności, co skutkuje poważnymi skutkami ubocznymi. Dlatego istnieje konieczność poszukiwania nowych terapeutyków, które mogłyby przynajmniej wspomóc jeśli nie zastąpić, obecnie stosowane metody leczenia. Białka szoku cieplnego (HSP) posiadają immunomodulacyjny potencjał, wykazany np. w badaniach przewlekłych chorób zapalnych stawów, takich jak RZS. Dlatego białka z tej rodziny znajdują się w orbicie zainteresowań immunologów, jako cząsteczki immunosupresyjne w kontekście różnych schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym. Jednak ich potencjalne zastosowanie medyczne, wymaga bardziej wszechstronnych badań wpływu HSP na różne typy chorób autoimmunizacyjnych o odmiennej etiologii. W ten nurt badań wpisuje się przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani Jagody Mantej.

Praca została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Stefana Tukaja, prof. UG. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zestawu czterech publikacji eksperymentalnych (dwukrotnie Cell Stress Chaperones, Front. Immunolog., oraz Exp Dermatol.), oraz krótkiego ogólnego wprowadzenia poprzedzającego wszystkie publikacje w formie streszczenia w języku polskim. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku angielskim, bibliografię, a także opis dorobku naukowego kandydatki oraz oświadczenia współautorów publikacji włączonych

UL. GRONOSTAJOWA 7
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 12-664-6127
EMAIL: JOANNA.CICHY@UJ.EDU.PL

do pracy doktorskiej. W jednej publikacji doktorantka jest pierwszym autorem, a w pozostałych trzech, pierwszym współautorem. W dorobku doktorantki znajduje się łącznie czternaście publikacji (włączając w to cztery publikacje przedstawione do oceny w ramach rozprawy doktorskiej) i współautorstwo w jednym rozdziale w monografii. W pozostałych publikacjach, autorka nie pełni roli pierwszoplanowego autora.

Uwagi szczegółowe:

W kilkunastu streszczeniu, doktorantka zwięźle uzasadnia konieczność poszukiwania nowych terapii leczenia chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, opisuje pokrótce białka HSP a następnie prezentuje cel pracy. W kilku paragrafach, przedstawia i komentuje kolejno wyniki czterech publikacji, wchodzących w skład dorobku doktorskiego. Streszczenie kończy się kilku zdaniowym podsumowaniem całości uzyskanych wyników.

Cel pracy.

Głównym celem badań była charakterystyka immunomodulacyjnych właściwości zewnątrzkomórkowych białek z rodziny HSP; Hsp-60, Hsp-70 i/lub Hsp-90 w czterech typach schorzeń; RZS, dwóch chorobach skóry, tj. łuszczycy i EBA (nabytym pęcherzowym oddzielaniem się naskórka), oraz w przebiegu infekcji Sars-CoV2. Ten ostatni aspekt badań był podyktowany podobieństwem strukturalnym białek wirusa z immunogennymi białkami HSP, ujawnionym we wcześniejszych badaniach *in silico*.

Wyniki i dyskusja.

Pierwsze dwie z czterech publikacji bazują na ocenie poziomu przeciwciał o swoistości anty Hsp-60, anty Hsp-70 i anty Hsp-90 w surowicy; (i) dawców cierpiących na RZS w stosunku do dawców zdrowych, lub w drugim przypadku (ii) seropozytywnych ozdowieńców Sars-Cov2, względem zdrowych seropozytywnych dawców, którzy uzyskali odporność humoralną w wyniku szczepień na SARS-Cov2, lub zdrowych dawców seronegatywnych. Badania wykonano za pomocą wcześniej opracowanego immunoenzymatycznego testu ELISA. Wykazano znacząco wyższe miana przeciwciał anty-HSP jedynie u dawców chorych na RZS w stosunku do dawców zdrowych. Miana te nie korelowały z aktywnością lub postępem choroby, natomiast w przypadku niektórych klas przeciwciał anty-HSP korelowały pozytywnie lub negatywnie z poziomami niektórych cytokin prozapalnych. W przypadku badań pacjentów w kontekście Sars-Cov2 nie ujawniono związku pomiędzy poziomem przeciwciał anty-HSP a przebytą infekcją lub szczepieniem na Sars-Cov2.

W dwóch kolejnych publikacjach, których przedmiotem były chroniczne zapalne choroby skóry, łuszczycy i EBA, użycie eksperymentalnych modeli zwierzęcych pozwoliło na bardziej mechanistyczne badania wpływu białek Hsp-70 na przebieg tych chorób i naturę odpowiedzi immunologicznej. Zastosowano rekombinowane lub oczyszczone preparaty białek HSP,

różnego pochodzenia lub egzogenne przeciwciała anty-HSP i oceniano; rozległość zmian skórnych, takich jak grubość naskórka czy nacieki zapalne. Docelowo zbadano również obecność regulatorowych i prozapalnych limfocytów T, produkujących charakterystyczną dla patogenezы tłuszczycy interleukinę 17. Wyniki tych badań, mogły sugerować, że immunizacja białkiem Hsp-70, lub podanie przeciwciał anty Hsp-70 wpływa korzystnie na przebieg tłuszczycy. W przypadku EBA, zaobserwowano jednak, odwrotną tendencję. W tym wypadku, zastosowanie rekombinowanego białka Hsp-70 prowadziło do wzmożenia objawów choroby.

Wnioski ogólne

Pozytywnym, zasługującym na podkreślenie aspektem pracy jest imponujący liczebnie dorobek kandydatki, oraz duża ilość wykonanych analiz materiału klinicznego, co z pewnością wymagało pracowitości i zdyscyplinowania eksperymentatora.

Przedstawiona rozprawa jest jednak bardzo oszczędna w treści i rodzi więcej pytań niż odpowiedzi. Dla przykładu, w mojej opinii brakuje podsumowującego, immunologicznego opisu tego jak działają białka szoku cieplnego jako czynniki immunosupresyjne lub immunostymulujące (tłuszczycy v/s EBA). Dlaczego dobre efekty terapeutyczne osiąga się tylko przy użyciu niektórych preparatów HSP? Czy podobieństwo czy też różnice pomiędzy szczepionym białką i dawką tych preparatów HSP mają większe znaczenie dla efektu leczniczego? Ponadto jak tłumaczyć eksperymenty *in vitro*, w których badano wpływ białek Hsp-70 na funkcję wybranych komórek, np. proliferację komórek linii HaCaT, w kontekście uzyskanego wyniku *in vivo*? W badaniach *in vivo*, zarówno immunizacja przy użyciu białek HSP ale także zastosowanie przeciwciał anty-HSP ograniczało symptomy choroby. Zatem jak ten efekt terapeutyczny zależy od bezpośredniego efektu samego białka HSP a jak od przeciwciał anty- HSP?

Oprócz chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, układ immunologiczny jest również w centrum patogenezы innych schorzeń, takich jak choroby alergiczne czy nowotworowe. Czy badania białek HSP w tym przypadku również były wykonywane, aby pokazać unikalny wpływ tych białek na immunosupresję w przypadku niektórych procesów autoimmunizacyjnych?

Proponuje aby doktorantka odniosła się do tych zagadnień i przedstawiła swoje przemyślenia na ten temat podczas publicznej obrony.

Pod względem metodycznym, praca również mogłaby zyskać na bardziej rozbudowanym i jednoznacznym opisie dawców materiału biologicznego. Dla przykładu, nie znalazłam informacji na temat płci i sposobu leczenia dawców z RZS. Wydaje mi się to mało prawdopodobne, aby byli to dawcy natywni (nieleczeni), a rodzaj terapii mógł mieć wpływ na uzyskane wyniki testów immunoenzymatycznych. W przypadku „badanych kohort Sars-Cov2” wyniki immunoenzymatyczne mogłyby być bardziej jednoznaczne, gdyby zostały w

każdym przypadku uzupełnione o wyniki analiz PCR na obecność wirusa. Jeśli chodzi o test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko białkom z rodziny HSP, to tutaj doktorantka odwołuje się sekwencyjnie najpierw do wcześniejszej pracy zespołu, a później do swojej poprzedniej pracy (prezentowanej w rozprawie doktorskiej), w której nie ma odniesienia do swoistości tego testu względem białek HSP. A tymczasem, była doskonała okazja aby zademonstrować swoistość tego testu w stosunku do mysich przeciwciał anty HSP. Moim zdaniem taka okazja była w publikacji, w której zastosowano białko OVA zamiast białek HSP, do immunizacji myszy, w eksperymentalnym modelu łuszczycy.

Chciałam również zachęcić doktorantkę do dyskusji na temat postulowanego efektu imikwimodu (IMQ) na keratynocyty (linię HaCAT). Pomimo tego, że zastosowanie IMQ spektakularnie symuluje efekty łuszczycy w mysim modelu *in vivo*, co również widać w przedstawionej pracy doktorantki z Front. Immunol., to ogólnie uważa się, że IMQ nie działa bezpośrednio na keratynocyty. To inne składniki, zawierającego IMQ kremu Aldara, mają wpływać bezpośrednio na te komórki naskórka. Czy linia HaCAT różni się pod tym względem od pierwotnych keratynocytów?

Wnioski końcowe

Powyższe uwagi i sugestie nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy, którą cechuje spójność tematyczna i podjęcie ważnego tematu badawczego jakim jest lepsze zrozumienie podłoża chorób autoimmunizacyjnych i znalezienie nowych strategii leczenia tych schorzeń.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Jagody Mantej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

