

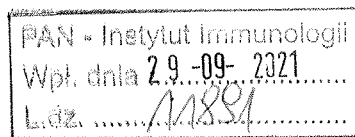
Prof. dr hab. n. med. Dorota Darmochwał-Kolarz Rzeszów, 23 września 2021 roku.

Katedra Położnictwa i Ginekologii

Instytut Nauk Medycznych

Kolegium Nauk Medycznych

Uniwersytet Rzeszowski



Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych

Mgr Anny Kędzierskiej

pt. „Tregitopy – nowe cząsteczki immunoregulatorowe  
w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem”.

Warunkiem prawidłowego rozwoju ciąży jest powstanie prawidłowych interakcji między matką a płodem. Obecność w organizmie matczym allogenicznego płodu wywołuje stan tolerancji immunologicznej, który umożliwia implantację, a następnie rozwój zarodka i płodu. Powikłania ciąży, takie jak: poronienia i stan przedzucawkowy powiązane są z nieprawidłowymi mechanizmami tolerancji immunologicznej. Szacuje się, że co czwarta rozpoznana ciąża ulegnie poronieniu. W 85% przypadków do straty ciąży dochodzi już w pierwszym trymestrze. Powtarzające się straty ciąży w pierwszym trymestrze są wciąż nierozwiązanym problemem medycznym i naukowym. W ponad połowie przypadków powtarzających się poronień nie udaje się ustalić przyczyny straty ciąży.

Wśród poznanych typów komórek, czynników immunologicznych i rozpuszczalnych cząsteczek regulatorowych przyczyniających się do ustalenia tolerancji wobec antygenów płodowych, istotną rolę przypisuje się limfocytom T regulatorowym (Tregs). Badania potwierdzają istotną rolę limfocytów T regulatorowych o fenotypie  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  w utrzymaniu ciąży, zarówno u myszy, jak i u człowieka. Spadek liczby i aktywności limfocytów Treg jest

obserwowany u kobiet w przypadku samoistnych poronień, w porównaniu do kobiet z ciążą przebiegającą prawidłowo. Wykazano również istotną rolę limfocytów B regulatorowych (Bregs) w mechanizmie utrzymania ciąży. Liczba limfocytów Bregs wzrasta u kobiet w ciąży przebiegającej prawidłowo w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży i zmniejsza się w przypadku poronień samoistnych w porównaniu do kobiet w ciąży przebiegającej prawidłowo.

Na modelu mysim wykazano, że dożylnie podanie immunoglobulin, zawierających szeroki wachlarz przeciwciał pochodzących z osocza osobników zdrowych obniża wskaźnik poronień w mysim modelu poronnym. U kobiet ciężarnych immunoglobuliny podawane dożylnie są jednym z rodzajów terapii proponowanej w leczeniu powikłań ciąży zwłaszcza o podłożu autoimmunologicznym. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że główny mechanizm działania IVIg jest związany z hamowaniem aktywności komórek o naturalnej cytotoksyczności NK, modulacją funkcji komórek prezentujących antygen (APC), neutralizacją cytokin i autoprzeciwciał, hamowaniem różnicowania limfocytów B i ekspansją limfocytów T regulatorowych. Przeskanowanie dostępnych sekwencji IgG w celu odnalezienia sekwencji o wysokim powinowactwie do głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC klasa II) pozwoliło na odkrycie konserwatywnych epitopów dla receptorów limfocytów T (TCR). Niespecyficzne przeciwciała obecne w IVIg mogą być internalizowane i przetwarzane przez APC w wyniku wewnątrzkomórkowej proteolizy peptydów, a powstałe peptydy (epitopy) są prezentowane limfocytom Treg przez kompleks zgodności tkankowej typu II (MHC II). Powstały kompleks MHC II – epitop z receptorem limfocytów T prowadzi do zmniejszenia ekspresji cząstek kostymulujących (CD80, CD86) na komórkach prezentujących antygen, a następnie do aktywacji i proliferacji istniejących limfocytów Tregs oraz powstania indukowanych komórek Tregs. Naturalne epitopy Tregs o wysokim powinowactwie do MHC II nazywane są tregitopami (epitopy komórek T regulatorowych).

W tym kontekście wybór przez Doktorantkę tematu pracy doktorskiej jest właściwy, aktualny i celowy.

Rozprawa doktorska stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach ujętych w wykazie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 lipca 2019 roku.

Autorka jasno i precyzyjnie przedstawiła cele swoich badań. Celem pracy doktorskiej było zbadanie czy tregitopy rozpoznawane przez receptor limfocytów T uczestniczą w rozwoju tolerancji w przebiegu ciąży u myszy.

Cele szczegółowe Doktorantki były następujące: weryfikacja funkcjonalności nowych potencjalnych tregitopów w indukowaniu ekspansji limfocytów T regulatorowych; zbadanie czy wczesne podanie dwóch epitopów o znanych sekwencjach pochodzących z mysiej IgG, mysiego tregitopu 167 oraz 289 może zapobiegać poronieniu w mysim modelu ciąży podatnej na poronienia; zbadanie czy wczesne podanie wyselekcjonowanych potencjalnych tregitopów zapobiega poronieniu w mysim modelu ciąży podatnej na poronienia.

W rozdziale „Materiał i Metody” Autorka dokładnie przedstawiła badaną grupę, tj. samice myszy szczepu CBA/J oraz samice szczepu C57BL6Foxp3<sup>GFP</sup> oraz metody badawcze: metody izolacji splenocytów i komórek z węzłów chłonnych ciężarnych samic CBA/J oraz samic szczepu C57BL6Foxp3<sup>GFP</sup>, metody magnetycznego sortowania komórek, metody hodowli komórek prezentujących antygen z naiwnymi limfocytami T, metodę wieloparametrycznej analizy cytometrycznej, metodę immunoenzymatyczną oraz metody projektowania tregitopów.

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą parametrycznej lub nieparametrycznej analizy wariancji (ANOVA) w zależności od rozkładu normalnego otrzymanych danych. Rozkład normalny został zweryfikowany za pomocą testu Shapiro-Wilka. Homogenność wariancji sprawdzono przy pomocy testu Levena. Dane spełniające założenia homogenności wariancji oraz rozkładu normalnego analizowano jednoczynnikową ANOVA z wykorzystaniem testów *post-hoc* z poprawką Benferroniego. Dane nie spełniające założeń o homogenności wariancji i rozkładzie

normalnym analizowano testem Kruskala-Willisa z zastosowaniem testów *post-hoc* z poprawką Dunna. We wszystkich analizach ustalono poziom istotności  $p$  na poziomie 0,05. Dane analizowano w programie statystycznym GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA).

Metody badawcze zostały dobrane właściwie przez Autorkę i odpowiadają podjętym zadaniom. Zastosowane przez Doktorantkę metody analiz statystycznych są prawidłowo dobrane i pozwalają na wiarygodne wnioskowanie.

Na wszystkie doświadczenia z użyciem modelu zwierzęcego Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (nr zgody 53/2015).

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Analiza *in vitro* zaprojektowanych sekwencji umożliwiła pozytywną weryfikację tolerogenicznego potencjału dwóch nowych tregitopów.
2. Podaż dwóch tregitopów o znanych sekwencjach pochodzących z mysiej IgG znacząco zwiększyła odsetek limfocytów T regulatorowych, produkcję Interleukiny-10 przez limfocyty Treg i limfocyty Breg oraz zmieniła odpowiedź kostymulującą komórek prezentujących antygen, przyczyniając się do zmniejszenia śmiertelności płodów w mysim modelu ciąży podatnej na poronienia.
3. Podaż nowego peptydu zlokalizowanego w cząsteczce CD91 (SGS) myszom skłonny do poronień spowodowała zwiększenie proporcji Tregs wśród limfocytów T podwyższenie stężenia Interleukiny-2 oraz Interlukiny-10 w surowicy oraz obniżenie ekspresji cząsteczek kostymulujących na komórkach prezentujących antygen APC, przyczyniają się do wytworzenia stanu tolerancji i zmniejszenia śmiertelności płodów.

4. Zaprojektowany in silico peptyd SGS spełnia kryteria tregitopu, ponieważ jego sekwencja jest obecna w białkach ludzkich, jest konserwatywna i może wiązać się z MNC II.

Doktorantka umiejętnie i krytycznie dokonała analizy otrzymanych wyników oraz odniosła je do danych z literatury. Autorka dała się poznać jako uważny i sumienny znawca literatury przedmiotu oraz wykazała się zdolnością do przejrzystej narracji w pracy naukowej.

Uważam, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione sobie cele badawcze.

Mgr Anna Kędzierska dowiodła swej dojrzałości jako naukowiec. Rozprawa jest pracą wyróżniającą się. Godny uwagi jest logiczny, precyzyjny opis i przedstawienie problemu, jak i wyników własnych. Praca doktorska stanowi istotny wkład w badaniach nad ciążą zagrożoną poronieniem.

Rozprawa pt. „Tregitopy – nowe cząsteczki immunoregulatorowe w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem” spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk biologicznych.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Anny Kędzierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Rzeszowski  
Kolegium Nauk Medycznych  
Instytut Nauk Medycznych  
Kierownik Katedry Położnictwa i Ginekologii

*prof. dr hab. n. med. Dorota Darmochwał-Kolarz*