

**Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Magdaleny Maciuszek

zatytułowanej

„Badania mechanizmów regulujących polaryzację makrofagów ryb”

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Magdaleny Maciuszek wykonana pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. Magdaleny Chadzińskiej bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Immunologii Ewolucyjnej, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, w Krakowie. Badania Zakładu od lat koncentrują się wokół mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację i regulację przebiegu wrodzonej reakcji odpornościowej. A co bardzo ważne i unikatowe, dotyczą ewolucyjnych powiązań pomiędzy układem odpornościowym a neuroendokrynnym. Doktorantka w swojej pracy słusznie zwraca uwagę na to, że makrofagi zarówno u ryb jak i u innych kręgowców w tym ssaków, są niewątpliwie jednymi z najważniejszych komórek układu odpornościowego, jednakże ich rola wciąż nie została do końca wyjaśniona. Obecnie wiadomo już, że w reakcji na zmiany otoczenia dochodzi do klasycznej (M1) lub alternatywnej (M2) polaryzacji tych komórek, dzięki czemu mogą one uczestniczyć zarówno w promowaniu procesów zapalnych, jak i w ich wygaszaniu. Makrofagi mogą bowiem zmieniać swój fenotyp, a w konsekwencji być źródłem mediatorów zarówno o profilu prozapalnym, jak i przeciwzapalnym. Badania ostatnich lat wciąż przynoszą nowe informacje na temat cytokin i hormonów regulujących aktywację/polaryzację makrofagów. Jednakże zrozumienie złożoności zachodzących procesów wciąż wymaga wnikliwych badań. Ponadto, nadal niewiele wiadomo jak na makrofagi, a w konsekwencji na przebieg reakcji zapalnej, wpływają środowiskowe czynniki hormonalnie czynne. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że zdecydowana większość eksperymentów jest wykonywana na ssakach, głównie na gryzoniach, natomiast z ewolucyjnego punktu widzenia niezwykle cenne jest prowadzenie badań porównawczych na rybach, jako najstarszej grupie kręgowców z w pełni rozwiniętą odpowiedzią immunologiczną.

W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej wydaje się bardzo trafna. Celem rozprawy było zweryfikowanie hipotezy zakładającej, że lipopolisacharyd, cytokiny (interferon γ 2, interleukina 4/13B), hormony steroidowe (kortyzol i 17 β -estradiol) oraz środowiskowe czynniki endokrynnie czynne (17 α -etynyloestradiol i 4-tert-oktylofenol) modyfikują u karpia (*Cyprinus carpio* L.) przebieg wrodzonej reakcji odpornościowej poprzez wpływ na aktywność, a także polaryzację makrofagów.

Cykl prac stanowiący podstawę postępowania doktorskiego, składa się z 4 oryginalnych publikacji. Doktorantka umieściła na końcu swojej rozprawy oświadczenia, że współautorzy wszystkich tych prac wyrazili zgodę na ich wykorzystanie w przewodzie doktorskim. Przedstawiona do oceny praca składa się z rozdziałów takich jak: spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza badawcza, wyniki wraz z publikacjami stanowiącymi podstawę rozprawy doktorskiej, dyskusja, wnioski końcowe, bibliografia oraz oświadczenia współautorów. Ponadto, w manuskryptach Doktorantka udokumentowała, że badania były prowadzone za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach (*numery uzyskanych zgod to 291 i 292*). Logiczny układ pracy doktorskiej, dojrzałe opracowanie, poprawny styl, właściwe cytowanie literatury, a także szczegółowa dyskusja wyników prezentowanych w 4 pracach oryginalnych wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej.

W pierwszym rozdziale, na 16 stronach Wstępu, Doktorantka w sposób syntetyczny omawia funkcjonowanie układu odpornościowego u ryb, ze szczególnym uwzględnieniem reakcji zapalnej. Dokonuje również wnikliwego przeglądu literaturowego i omawia rolę monocytów/makrofagów poświęcając sporo uwagi wciąż słabo poznanemu zjawisku polaryzacji tych komórek. W kolejnej części w sposób wyczerpujący omawia neuroendokrynną regulację reakcji odpornościowej, ze szczególnym uwzględnieniem roli dwóch hormonów steroidowych, kortyzolu i estradiolu. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka przytoczyła dane literaturowe dotyczące wpływu środowiskowych związków endokrynnie czynnych na zaburzenia hormonalne u ryb, a następnie omówiła wpływ dwóch z nich 17 α -etynyloestradiolu oraz 4-tert-oktylofenolu na układ odpornościowy.

W drugim rozdziale Doktorantka przedstawiła w 5 punktach główne założenia pracy oraz szczegółowe - bardzo ambitne - cele, realizowane w ramach rozprawy doktorskiej takie jak: 1. Określenie wpływu lipopolisacharydu, lipopolisacharydu z interferonem γ 2 oraz interleukiny 4/13B na polaryzację makrofagów w warunkach *in vitro* oraz na ekspresję genów kodujących cząsteczki zaangażowane w syntezę, konwersję i wiązanie kortyzolu; 2. Zbadanie

roli hormonów steroidowych (kortyzolu i 17β -estradiolu) i związków środowiskowych endokrynnie czynnych (17α -etynyloestradiolu i 4-tert-oktylofenolu) w polaryzacji makrofagów w warunkach *in vitro*; 3. Sprawdzenie czy i w jaki sposób kortyzol endogennie produkowany i/lub konwertowany w makrofagach wpływa na ich polaryzację; 4. Określenie w warunkach *in vivo* wpływu 24h stresu na polaryzację makrofagów u karpia; 5. Zbadanie warunkach *in vivo* wpływu 17β -estradiolu, 17α -etynyloestradiolu i 4-tert-oktylofenolu na przebieg reakcji zapalnej wywołanej zakażeniem bakteriami *Aeromonas salmonicida*.

W trzecim rozdziale Doktorantka rzetelnie i przejrzyście omawia opublikowane wyniki swoich eksperymentów. Szczególną uwagę zwraca imponująca ilość prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach o zakresie międzynarodowym stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Wyniki swoich badań eksperymentalnych mgr Magdalena Maciuszek opublikowała w 4 pracach oryginalnych w następujących czasopismach w 2019 w *Fish and Shellfish Immunology* (MNI_{SW}=140, IF=3,298), natomiast w 2020 w *International Journal of Molecular Science*. (MNI_{SW}=140, IF=4,556); *Fish Physiology and Biochemistry* (MNI_{SW}=70, IF=2,242) oraz *Fish and Shellfish Immunology* (MNI_{SW}=140, IF=3,298). Sumaryczna ilość punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego czasopism, w których zostały opublikowane wyżej wymienione manuskrypty prac wynosi 490, a łączny Impact Factor 13,394. Na uznanie zasługuje oryginalny pomysł zrealizowanych badań, bardzo dobry warsztat metodyczny oraz umiejętność opracowania tak bogatego materiału doświadczalnego celem przygotowania do druku w renomowanych czasopismach. Uwagę zwraca również fakt, że wszystkie prace zostały przygotowane w oparciu o międzynarodową współpracę z zespołem prof. Lidy Verburg-van Kemenade z Uniwersytetu Wageningen w Holandii.

W czwartym rozdziale zostały wydzielone dwa główne podrozdziały, w których Doktorantka dyskutuje najpierw uzyskane wyniki z eksperymentów *in vitro*, a następnie *in vivo*. Bardzo sumiennie i logicznie interpretuje opublikowane rezultaty i dyskutuje z dostępną wybraną literaturą (w pracy zamieszczono aż 311 pozycji piśmiennictwa). W tej części pracy uwagę zwracają również starannie przygotowane ryciny i tabele. Szczególnie pragnę podkreślić, że dużym ułatwieniem w usystematyzowaniu uzyskanych licznych danych jest Tabela 1 wyróżniająca się bardzo szczegółowym przedstawieniem rezultatów z badań *in vitro* przeprowadzonych z wykorzystaniem hodowli komórkowych karpia a porównująca wpływ stymulacji lipopolisacharydem, wybranymi cytokinami, hormonami steroidowymi oraz środowiskowymi czynnikami endokrynnie czynnymi na ekspresję i aktywność mediatorów pro-/przeciwzapalnych w monocytach/makrofagach nerki główowej karpia. W tych eksperymentach wykazano, że polaryzację klasyczną makrofagów (M1) powoduje zarówno

stymulacja lipopolisacharydem, jak i lipopolisacharydem z interferonem $\gamma 2$, co powoduje zwiększoną ekspresję mediatorów prozapalnych, natomiast alternatywną polaryzację (M2) uzyskano po stymulacji interleukiną 4/13B. Co ważne wykazano, że makrofagi fazy M1 i M2 różnią się ekspresją enzymów zaangażowanych w konwersję kortyzolu, natomiast egzogeny kortyzol zmienia polaryzację makrofagów M1 powodując obniżenie ekspresji stymulowanych lipopolisacharydem mediatorów zapalenia. Badania niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują ponadto, że pod wpływem 17β -estradiolu w stymulowanych lipopolisacharydem monocytach/makrofagach nerki głowowej dochodzi do obniżenia zarówno ekspresji mediatorów pro- jak i przeciwzapalnych, natomiast działające proestrogenie 17α -etynyloestradiol oraz 4-tert-oktylofenol w wysokich stężeniach hamują odpowiedź komórkową zależną od limfocytów Th1. Ponadto, Doktorantka sugeruje w pracy *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, że monocyty/makrofagi pochodzące z nerki głowowej i właściwie różnią się ekspresją mediatorów zapalnych oraz odpowiedzią na stymulację lipopolisacharydem - jest to w mojej ocenie bardzo ciekawy wynik, jednakże dyskusja na ten temat jest niewystarczająca, Doktorantka powinna lepiej rozwinąć ten temat. W drugim podrozdziale czwartego rozdziału Doktorantka dyskutuje wyniki badań *in vivo*, w których wykazano, że u karpia stres unieruchomienia powoduje w monocytach/makrofagach nerki głowowej wzrost ekspresji mediatorów przeciwzapalnych, co prawdopodobnie związane jest z nasileniem alternatywnej polaryzacji tych komórek. Ponadto, co bardzo ważne po raz pierwszy dowiedziono, że ekspozycja na 17β -estradiol w paszy ukierunkowuje polaryzację monocytów/makrofagów nerki głowowej w kierunku M2, co skraca stan zapalny wywołany infekcją bakteryjną *Aeromonas salmonicida*. Pragnę podkreślić, że w tej części pracy Doktorantka zamieściła kolejną bardzo starannie opracowaną Rycinę 8, przedstawiającą w sposób klarowny uzyskane w badaniach *in vivo* dane dotyczące wpływu 17β -estradiolu, 17α -etynyloestradiolu oraz 4-tert-oktylofenolu podczas infekcji bakterią *Aeromonas salmonicida* na ekspresję/aktywność mediatorów pro i przeciwzapalnych, receptorów estrogenowych i aromataz, oraz na liczbę fagocytów i limfocytów u karpia. Do wyjaśnienia jednak pozostaje, dlaczego do wywołania infekcji Doktorantka wybrała akurat *Aeromonas salmonicida*. Co ważne w pracy wykazano znaczące różnice w przebiegu reakcji zapalnej po ekspozycji ryb na proestrogenne środowiskowe związki endokrynnie czynne. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że 17α -etynyloestradiol wpływa na komórki układu odpornościowego, zaburzając prawidłowy przebieg reakcji immunologicznej w odpowiedzi na infekcję bakteryjną. Powoduje zwiększony napływ fagocytów do miejsca zapalenia, a komórki te wykazują zmiany w ekspresji kluczowych mediatorów regulujących odpowiedź zapalną. Uzyskane dane wykazały, że 17α -

etynyioestradol wydłuża i zaostrza przebieg infekcji bakteryjnej. Ponadto Doktorantka wykazała po raz pierwszy, że również 4-tert-oktylofenol, obniża ekspresję kluczowych mediatorów uczestniczących w odpowiedzi komórkowej u karpia.

Mimo bardzo dobrej pracy, Doktorantka nie uniknęła drobnych niedociągnięć edytorskich np. „nad szczurzymi makrofagami otrzewnymi”, „wycieszenie zapalenia” czy „tę część badań”, które jednak nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej z całą pewnością zaprezentowano przekonujące dowody na to, że u ryb kierunek polaryzacji monocytów/makrofagów zależy zarówno od środowiska cytokinowego jak i hormonalnego. Ponadto, że polaryzacja tych komórek związana jest ze zmianami poziomu wewnątrzkomórkowego kortyzolu, który za pośrednictwem intrakryny interakcji z receptorami dla glikokortykoidów reguluje produkcję IL-10. W swoich badaniach Doktorantka potwierdziła, że również u karpia ważnym hormonem immunoregulacyjnym reakcji zapalnej jest 17β -estradol. Co najistotniejsze, zaprezentowane badania wnoszą niezmiernie ważne dowody wskazujące, że obecne w środowisku wodnym proestrogenne związki endokrynnie czynne mogą nie tylko wpływać na gospodarkę hormonalną ryb, ale również modulować odpowiedź immunologiczną i w znaczący sposób przyczyniać się do zwiększenia ich podatności na zakażenia, a nawet przyczyniać się do ich śmiertelności, co jest niezwykle groźne w świetle wzrastającego zanieczyszczenia wód tego typu substancjami.

Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr Magdaleny Maciuszek zatytułowana „*Badania mechanizmów regulujących polaryzację makrofagów ryb*” spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym stawiane rozprawie doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk biologicznych, dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Maciuszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na bardzo wysoką wartość pracy, której wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o łącznym Impact Faktor 13,394 składam wniosek o przyznanie Doktorantce wyróżnienia.

Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika