

Dr hab. n. med. Danuta Gutowska-Owsiak
Profesor UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, dnia 03.07.2023

Ocena rozprawy doktorskiej

„Wydzielniczy inhibitor proteaz leukocytarnych (SLPI) w patofizjologii skóry”

autorstwa mgr Agnieszki Morytko, przeprowadzona w Zakładzie Immunologii

Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

pod opieką promotorską prof. dr hab. Joanny Cichy

Przewlekłe choroby skóry, takie jak łuszczyca i atopowe zapalenie skóry (AZS) są bardzo istotnym problemem zdrowotnym, dotyczącym sporej części populacji, w zależności od wieku. Obciążenie systemu ochrony zdrowia spowodowane tymi chorobami jest bardzo znaczne, ponieważ mają one rozległe efekty systemowe, a ich wpływ na organizm jest dużo szerszy niż widoczne z zewnątrz zmiany skórne. W niniejszej pracy Doktorantka skupiła się na ocenie regulacji i roli **wydzielniczego inhibitora proteaz leukocytarnych (SLPI)**, którego regulacja i rola w naskórku oraz skórze właściwej nie były do tej pory szczegółowo poznane, pomimo, iż dane literaturowe dokumentują wzrost poziomu ekspresji tego białka w chorobach skóry. Zrozumienie mechanizmów powodujących wzrost poziomu SLPI, a zwłaszcza poznanie roli tego białka w patogenezie może uwidocznic nowe cele terapeutyczne dla pacjentów dermatologicznych.

W ramach badań Doktorantka przeprowadziła ocenę ekspresji SLPI w skórze chorych z na łuszczycę i AZS, potwierdzając doniesienia o jej zwiększeniu w tych chorobach, podczas gdy ekspresja w zdrowej skórze jest znikoma. Ustalenia odnoszą się przede wszystkim do poziomu białka, ponieważ poziom mRNA przyniósł nieco odmienne wyniki, zwłaszcza dla skóry objętej AZSem. Doktorantka ustaliła również, że oprócz keratynocytów, komórki immunologiczne, tj. eozynfile i neutrofile (odpowiednio w AZS i łuszczycy) również zawierają to białko u pacjentów. W mojej ocenie brakuje jednak bezpośrednich porównań ekspresji pomiędzy skórą AZS i Ps, co uniemożliwia odniesienie do siebie tych dwóch stanów chorobowych.

W kolejnych krokach, Doktorantka zajęła się określeniem roli czynników istotnych dla chorób skóry, m. in. wpływem cytokin i czynników patogennych. Badania te obejmowały użycie keratynocytów

ludzkich na różnych poziomach różnicowania, tj. komórki niezróżnicowane, komórki częściowo zróżnicowane (w modelu 2D oraz w modelu 2D z długim czasem po osiągnięciu konfluencji), oraz komórki na wielu etapach różnicowania, tworzące wielowarstwowy odpowiednik tkanki naskórkowej (model organotypyczny 3D). W celu wstępnej walidacji modeli, Doktorantka wykorzystała zmiany morfologiczne i metaboliczne między modelami, a także barwienie immunofluorescencyjne nakierowane na keratynę-1. Następnie Doktorantka potwierdziła, iż w trakcie różnicowania keratynocytów dochodzi do intensyfikacji ekspresji SLPI, co również jest zgodne z dotychczasowymi danymi literaturowymi. W celu opisanie lokalizacji białka SLPI w skórze Doktorantka używa określenia „keratynocyty warstwy rogowej naskórka”, co nie jest prawidłowe, ponieważ na tym etapie tych komórek już nie ma, istnieją tylko pozostałości (korneocyty), otoczone lipidową macierzą. Ponadto, ciężko wskazać na konkretną lokalizację ekspresji w warstwie rogowej analizując zdjęcia zamieszczone w pracy, z pewnością ciężko określić ją jako ewidentnie „komórkową” lokalizację, jak ujęte zostało to w pracy. Niestety nie mogę zgodzić się z interpretacją, że poziom ekspresji SLPI jest zależny od długości stymulacji i niezależny od różnicowania keratynocytów. Dwa porównywane modele 2D (model z dnia 3 i model z dnia 12 po osiągnięciu konfluencji) bardzo różnią się z powodu procesu różnicowania stymulowanego nasilonym kontaktem między komórkami (contact-dependent differentiation), zależnego od E-kadheryny. Dane literaturowe pokazują, że model taki demonstruje duży wzrost ekspresji białek zależnych od różnicowania z czasem, jest więc pośredni w stosunku do modelu z dnia 3 i modelu 3D. Relatywnie niższy poziom keratyny-1 w stosunku do modelu 3D, nie musi świadczyć braku różnicowania, a jedynie zahamowaniem stratyfikacji spowodowanego brakiem uniesienia komórek na granicę faz powietrze-medium. W związku z tym, ocena dodatkowych markerów różnicowania byłaby bardzo przydatna. Rycina 4.8 nie zawiera jednak żadnych danych odnośnie modelu z dnia 12, które najprawdopodobniej wskazywałyby na znaczne zmiany morfologii sugerujące terminalne różnicowanie w tym modelu.

Dalsza część pracy zawiera wyniki stymulacji keratynocytów syntetycznym dwuniciowym RNA (dsRNA; poly I:C) oraz patogenami (wirusem HSV-1 oraz różnymi szczepami gronkowca złocistego *S. aureus*). Uzyskane wyniki sugerują, że ekspozycja keratynocytów na dsRNA stymuluje ekspresję SLPI, natomiast infekcja wirusowa nie ma na nią wpływu. Na uwagę zasługuje zastosowanie kilku szczepów *S. aureus*, różniące się wirulencją od szczepu dzikiego ze względu na mutacje w kluczowych genach proteaz i czynników regulatorowych. Te eksperymenty zidentyfikowały spadek ekspresji na poziomie mRNA dla niemal wszystkich tych szczepów oraz szczepu dzikiego. Następnie Doktorantka skupiła się na określeniu poziomów SLPI w sytuacji zaburzonej homeostazy naskórka, co przeprowadzone było w modelu *in vivo* (myszy z deficytem genu dla regnazy-1 w naskórku), gdzie widoczne było nasilenie ekspresji tego białka. W tej części pracy doktorantka podjęła się również

próby ustalenia zależności między SLPI i Reg1, i chociaż wyniki nie są jednoznaczne, to starania w kierunku ustalenia mechanizmu regulacyjnego zasługują na uwagę. Negatywnym aspektem jest pewna niekonsekwencja modeli badawczych, np. badanie infekcji HSV-1 w modelu ND i 2D, natomiast infekcji *S. aureus* jedynie w modelu 3D. Utrudnia to porównanie tych patogenów pod kątem wpływu na ekspresję SLPI, zwłaszcza, iż model 3D ma wyższy stopień skomplikowania, co może maskować pewne efekty, które mogłyby być zaobserwowane w hodowli 2D.

Kolejny etap pracy zawierał ocenę wpływu cytokin prozapalnych, obserwowanych w łuszczycy i AZSie. Doktorantka skupiła się na interleukinie 1, interleukinie 17 i interleukinie 22, jako również onkostatynie M. Rola tych cytokin jest istotna z punktu widzenia patologii, zwłaszcza w łuszczycy, choć mogą mieć one rolę również w AZSie. Doktorantka zaobserwowała różnice w poziomie ekspresji SLPI pod wpływem działania cytokin, co może sugerować wpływ środowiska zapalnego na ekspresję tego białka. Jest to zgodne z literaturą ukazującą wzrost ekspresji mRNA dla SLPI po ekspozycji na histaminę. Natomiast ciężko interpretować wyniki uzyskane w modelu 3D, który demonstruje trend wzrostowy (statystycznie nieistotny) dla trzech cytokin, ze względu na małe n ($n=3$) modeli. W tej części badawczej rozczarowujący jest z pewnością brak oceny najbardziej dominujących cytokin obserwowanych w AZSie tj. interleukiny 4 i interleukiny 13, jak również interferonu- γ , obserwowanego w przewlekłych zmianach skórnych w tej chorobie.

Finalną część pracy stanowi ocena ekspresji SLPI w modelach zwierzęcych. W badaniach Doktorantka skorzystała z szeregu mysich modeli *in vivo*, w tym dwóch modeli AZS, modelu łuszczycowego i starzeniowego, zbadała również myszy z knock outem SLPI i IL-22. To pozwoliło na szerszą ocenę regulacji SLPI w procesach chorobowych w skórze. W przypadku AZSu, Doktorantka była w stanie wykluczyć znaczącą rolę tego białka w procesie sensytyzacji (w modelu z owalbuminą) i rozwoju zmian chorobowych (w modelu z analogiem witaminy D3). Natomiast w tym modelu, jak również w modelu zapalenia łuszczycopodobnego, zaobserwowano wzrost SLPI. Niestety, w pracy nie zostały przedstawione wyniki badań z imiquimodem przeprowadzone dla myszy z knock outem SLPI (w pracy jest natomiast wzmianka na temat zawierającej jej publikacji, w której Doktorantka również brała udział).

Oceniam, iż doktorantka mogła wykazać się trochę większą starannością, jeśli chodzi o przygotowywanie wykresów, rycin i ich opisów. Zdjęcia umieszczone na rycinach mogłyby być lepiej opisane, i zawierać informację na temat białek identyfikowanych na kolejnych sekcjach; na rycinach i w samym tekście pojawiają się literówki, zdarzają się niezgodności ryciny i opisu z tekstem (Ryc. 4.2), błędny jest zapis dotyczący myszy black 6. Wykresy powinny być bardziej czytelne bez odnoszenia się do legendy (np. 4.3c). Zarówno w części opisującej metodologię, jak i wyniki brakuje

informacji na temat warunków różnicowania, informacja odnośnie stężenia wapnia jest absolutnie krytyczna do oceny spodziewanego poziomu różnicowania i niezbędna do powtórzenia eksperymentów ujętych w pracy.

Podsumowując, praca zawiera szereg ciekawych obserwacji, umożliwiających kompleksowe spojrzenie na temat regulacji i roli SLPI, co czyni ją istotną z punktu widzenia badań nad fizjologią i przewlekłymi chorobami skóry. Dane zaprezentowane w niniejszej pracy zawarte zostały w ośmiu publikacjach, tj. pięciu oryginalnych artykułach badawczych i trzech pracach przeglądowych. Na pozytywną ocenę na pewno zasługuje zastosowanie szeregu modeli, łącznie z modelem organotypycznym 3D i kilkoma modelami *in vivo*. Dzięki temu, praca prezentuje szeroki wachlarz badawczy i z pewnością umożliwiła Doktorantce wykształcenie warsztatu umiejętności technicznych i ekspertyzy, przydatnej nie tylko w badaniach z zakresu skóry, ale również i w innych polach badawczych.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz.U. z 2018 r. poz.1668 – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie p. mgr Agnieszce Morytko, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.



Danuta
Gutowska-
a-Owsiak

Digitally signed
by Danuta
Gutowska-
Owsiak
Date: 2023.07.03
20:20:12 +02'00'