



ZAKŁAD MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ I IMMUNOREGULACJI
UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Białystok, 16 marca 2023

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych
pt. „Archeony halofilne jako stymulatory komórek układu odpornościowego człowieka”
autorstwa mgr. Krzysztofa Tadeusza Krawczyka
realizowanej pod kierunkiem
dr hab. Magdaleny Kowalewicz-Kulbat

Archeony to element mikroflory gleb, jezior, mórz i oceanów. W ostatnich latach udowodniono, że mogą również wchodzić w skład mikroflory komensalnej ludzi i zwierząt. W obrębie tej grupy można wydzielić archeony a) termofile bytujące w wodach o bardzo wysokich temperaturach (gorących źródłach czy w obrębie kominów hydrotermalnych); b) psychrofile oraz psychrotrofy żyjące w wodach lub glebie w bardzo niskich temperaturach; c) acidofile i alkalofile – bytujące w środowisku o odpowiednio ekstremalnie niskim lub wysokim pH; oraz d) halofile – bytujące w miejscach o wysokim zasoleniu. To właśnie archeony halofilne wydają się być niezwykle interesujące ze względu na ich potencjalne właściwości prozdrowotne. Niestety właściwości immunomodulujące tych mikroorganizmów nie zostały w wystarczający sposób poznane i opisane. W związku z powyższym wysoce interesująca i aktualna jest tematyka badań podjętych przez mgr Krzysztofa Krawczyka.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ charakterystyczny dla dysertacji na stopień naukowy doktora przygotowanej w formie mieszanej. Opracowanie merytoryczne poprzedza spis treści, wykaz opublikowanych prac włączonych do rozprawy doktorskiej, wykaz publikacji naukowych niewłączonych do dysertacji, wykaz komunikatów konferencyjnych, źródeł finansowania oraz wykaz skrótów. W części merytorycznej Doktorant zawarł 9 rozdziałów obejmujących wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki,

podsumowanie uzyskanych wyników, dyskusję, streszczenia w języku, polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa, obejmujący 132 pozycje aktualnej literatury. Na końcu dysertacji Doktorant załącza oświadczenie współautorów o udziale w publikacjach. Praca przygotowana jest starannie. Napisana jest poprawnie językowo i zrozumiale.

Pan mgr Krzysztof Krawczyk włączył do dysertacji 2 publikacje naukowe opublikowane na łamach *Frontiers in Immunology*, które jest uznanym periodykiem w dziedzinie immunologii. Kumulatywny IF włączonych do dysertacji manuskryptów to 17,574 pkt., co przekłada się na 280 pkt MEiN. W artykule poglądowym Pan mgr Krzysztof Krawczyk jest drugim autorem, natomiast w pracy oryginalnej pierwszym autorem. Zgodnie z załączonymi do dysertacji oświadczeniami udział Doktoranta w powstaniu obu manuskryptów był wiodący i przekraczał 50%, co świadczy o jego dużej samodzielności. Pan mgr Krzysztof Krawczyk jest również współautorem 9 prac opublikowanych w wiodących czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, co wskazuje na jego znaczne zaangażowanie w pracę badawczą. Na szczególną uwagę zasługują tu publikacje w *Allergy* oraz *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, a więc dwóch najwyżej punktowanych czasopismach w dziedzinie Alergologii. W jednej z nich Doktorant jest drugim autorem. Kumulatywny IF w momencie złożenia rozprawy to 66,823 pkt. co przekłada się na 1085 pkt MEiN. Wynik ten jest ponadprzeciętny. Doktorant uczestniczył również w licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. W mojej ocenie w rozprawie powinny zostać wymienione jedynie te doniesienia zjazdowe, które zostały wygłoszone osobiście przez Autora dysertacji.

Rozprawa powstała dzięki środkom zdobytym przez Doktoranta w ramach funduszy zewnętrznych uzyskanych podczas konkursu Narodowego Centrum Nauki Preludium 14 oraz wewnętrznych, a mianowicie dwóch dotacji celowych przyznanych przez Dziekana BiOŚ. Wskazuje to na wysokie umiejętności Doktoranta w planowaniu projektu naukowego oraz tworzenia wniosków grantowych, co jest niezwykle istotne dla rozwoju kariery naukowej i zasługuje na uznanie.

Wprowadzenie, stanowiące wstęp merytoryczny do rozprawy, obejmuje trzydzieści osiem stron w tym dziesięciostronicową publikację poglądową. W rozdziale tym Doktorant szczegółowo przedstawia najbardziej istotne zagadnienia związane z tematem badawczym. Wprowadzenie podzielone jest na 9 podrozdziałów. Doktorant opisuje w nich historię odkrycia i klasyfikację archeonów, ich budowę, podział oraz występowanie w obrębie

mikroflory ludzkiej. W dalszej części Doktorant charakteryzuje archeony halofilne, a następnie opisuje zastosowanie archeonów w przemyśle i medycynie wprowadzając czytelnika do publikacji pogładowej, w której wraz z współautorami dokonuje szczegółowej charakterystyki archeosomów oraz pęcherzyków stosowanych w produkcji szczepionek. W kolejnych podrozdziałach Doktorant opisuje komórki dendrytyczne, limfocyty T oraz toksyny gronkowcowe. Wprowadzenie napisane jest zrozumiale, odbiór ułatwiają zamieszczone tabele oraz ryciny (w tym jedna zawierająca zdjęcia własne). Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka kwestii:

- 1) Podczas opisu komórek dendrytycznych Doktorant zakwalifikował nieklasyczne monocyty jako ich subpopulację (strona 45). Zgodnie z obowiązującą nomenklaturą nieklasyczne monocyty to subpopulacja o fenotypie CD14⁺CD16⁺⁺ krążąca we krwi obwodowej. Powszechnie uznaje się ją za populację monocytów o aktywnościach prozapalnych odpowiadających makrofagom M1 (klasycznie aktywowanym). Oczywiście, znajdują się liczne dowody eksperymentalne wskazujące, że komórki te mogą różnicować się w kierunku komórek dendrytycznych. Nie kwalifikuje ich to jednak bezpośrednio do tej grupy.
- 2) Podczas charakterystyki komórek dendrytycznych Doktorant wprowadził skrót wywodzący się z języka polskiego, a następnie opisując subpopulacje tych komórek wprowadza skróty wywodzące się z języka angielskiego. Sugerowałbym stosowanie skrótów powszechnie uznanych w nomenklaturze, nawet jeśli wywodzą się one z języka angielskiego, tak jak ma to miejsce w przypadku innych skrótów stosowanych w dysertacji, np. dla komórek prezentujących antygen (APC). Jest to oczywiście jedynie drobna rada edycyjna.
- 3) W rozdziale charakteryzującym limfocyty T, Doktorant opisuje różne subpopulacje tych komórek. W mojej ocenie brakuje szerszego opisu różnych subpopulacji limfocytów T pomocniczych, włączając w to limfocyty T regulatorowe (Treg), Th9 oraz Th21 wraz z opisem charakterystycznych czynników transkrypcyjnych oraz markerów powierzchniowych dla wszystkich subpopulacji.
- 4) Doktorant opisuje limfocyty T obecne w tkankach jako populację komórek „stanowiącą pierwszą linię obrony przeciwko patogenom” (strona 51). Powszechnie wiadomo, że pierwszą linię obrony stanowi układ odporności nieswoistej, do której nie włącza się limfocytów T. Wydaje się, że Pan magister

posłużył się tu pewnym skrótem myślowym, znajdując się w tematyce odpowiedzi adaptacyjnej.

- 5) W rozdziale pojawiają się nieliczne błędy edycyjne, które nie mają wpływu na pozytywny odbiór całości.

W rozdziale „Cele pracy”, po krótkim wprowadzeniu Doktorant przedstawia główny cel podjętych badań polegający na „Charakterystyce wzbudzonej archeonami halofilnymi (*Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*) synapsy immunologicznej komórek dendrytycznych z komórkami limfoidalnymi izolowanymi z krwi obwodowej zdrowych dorosłych osób oraz określenie właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych w środowisku superantygeny – enterotoksyny B *Staphylococcus aureus* (SEB) w hodowlach *in vitro*”. Ponadto cel ogólny został wsparty pięcioma celami szczegółowymi obejmującymi: 1) charakterystykę oddziaływania archeonów halofilnych *Hrd. Rudnickae* lub *N. salaciae* z ludzkimi komórkami dendrytycznymi; 2) ocenę ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi *Hrd. Rudnickae* lub *N. salaciae* oraz wytwarzania wybranych cytokin; 3) ocenę odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4+ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi stymulowanymi archeonami *Hrd. Rudnickae* lub *N. salaciae*; 4) ocenę właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych *Hrd. Rudnickae* lub *N. salaciae* wobec komórek dendrytycznych, przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B *S. aureus* (SEB) jako superantygeny; oraz 5) ocenę wpływu archeonów halofilnych, *Hrd. Rudnickae* lub *N. salaciae*, na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T CD4+ przez komórki dendrytyczne w środowisku SEB.

Rozdział trzeci „Materiały i Metody” rozpoczyna się od opisu materiałów wykorzystanych w trakcie realizacji projektu. Materiał do badań stanowiła masa leukocytno-płytkowa pozyskana od 30 dawców krwi Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. Na przeprowadzenie badań Doktorant uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej (uchwała nr 3/KBBN – UŁ/II/2017, której kopia nie została załączona do dysertacji). Wszyscy dawcy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu naukowym. Wykorzystane w badaniu szczepy archeonów halofilnych (*Hrd. Rudnickae* oraz *N. salaciae*) zostały pozyskane z Uniwersytetu w Coimprui (Portugalia) dzięki uprzejmości prof. Milтона Simoesa da Costa oraz dr Luciany Albuquerque. W dalszej części doktorant szczegółowo wymienia wykorzystane podłoża do hodowli archeonów, podłoża do hodowli komórkowych,

surowice, bufory i roztwory laboratoryjne, zestawy do separacji magnetycznej, testy immunoenzymatyczne (wraz z zakresami detekcji zawartymi w Tabeli 3), odczynniki chemiczne, przeciwciała wykorzystywane do cytometrii przepływowej, odczynniki do mikroskopii fluorescencyjnej, plastiki laboratoryjne, sprzęt laboratoryjny oraz wykorzystane oprogramowanie. Opis wykonany jest starannie i zawiera informacje niezbędne do identyfikacji większości wykorzystanych materiałów. Chciałbym zwrócić uwagę, że dobrą praktyką jest określanie klonalności przeciwciał podając ich specyfikację, a w przypadku przeciwciał monoklonalnych również podanie wykorzystywanego klonu. Jest to oczywiście jedynie drobna uwaga, które może być pomocna w przyszłości podczas przygotowywania kolejnych manuskryptów. W podrozdziale „Metody”, Doktorant dokonuje szczegółowego opisu wykorzystanych technik laboratoryjnych, a więc hodowli archeonów halofilnych, przygotowanie ich zawiesiny do stymulacji komórek dendrytycznych, izolacji PBMC, izolacji magnetycznej wybranych populacji i subpopulacji komórek układu immunologicznego, różnicowania monocytów w kierunku komórek dendrytycznych, stymulacji komórek dendrytycznych, ko-hodowli pre-edukowanych komórek dendrytycznych z wybranymi populacjami limfocytów T, oceny stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny, oceny pęknięć DNA, cytometrii przepływowej, testów immunoenzymatycznych (ponownie podając zakresy detekcji wybranych zestawów w Tabeli 4), a także wykorzystane metody analizy statystycznej. Na szczególną uwagę zasługuje różnorodność nowoczesnych metod analitycznych wykorzystanych podczas realizacji projektu doktorskiego. Dziwić może zastosowanie dwukolorowej fluorescencji do analizy komórek dendrytycznych przy wykorzystaniu cytometru o znacznie większych możliwościach analitycznych. Nie jest to oczywiście błędem, ale zmniejsza w sposób znaczący ilość uzyskiwanych danych przy zaprezentowanej liczbie analizowanych receptorów (panelu przeciwciał). Należy jednak podkreślić, że wszystkie opisy wykonane są starannie w sposób pozwalający w razie potrzeby na powielenie wykonanych badań. Wskazuje to na kompleksowe przygotowanie Doktoranta do pracy laboratoryjnej. Chciałbym jednak prosić o udzielenie odpowiedzi na kilka pytań technicznych:

1. Przedstawione na Rycinie 6 cytogramy ukazują komórki po separacji magnetycznej, mianowicie monocyty. Populacja ta jest dość niejednorodna i cechuje się niskimi wartościami ziarnistości (SSC) oraz zróżnicowaną wielkością (FSC). Czy w trakcie optymalizacji procesu izolacji lub w trakcie prowadzenia badań

oceniana była żywotność komórek po izolacji magnetycznej? Czy oceniono jakie komórki były obecne po procesie „zagęszczenia” populacji CD14+?

2. Jak była czystość limfocytów T CD4+, antygenowo dziewiczych limfocytów T CD4+, limfocytów T CD4+ pamięci immunologicznej, po izolacji z frakcji zubożonej o komórki wykazujące ekspresję CD14?
3. Czy oceniano efektywność różnicowania monocytów w kierunku komórek dendrytycznych?
4. Czy oceniono żywotność limfocytów T po kriokonserwacji?
5. Czy ko-hodowle prowadzone były w układach autologicznych czy allogenicznych (mieszane hodowle leukocytów)?
6. Jaką strategię bramkowania oraz analizy danych przyjęto podczas analizy cyklu komórkowego? Czy zastosowano dyskryminację dubletów?

Rozdział „Wyniki” składa się z 5 podrozdziałów w których Doktorant przedstawia rezultaty przeprowadzonych analiz laboratoryjnych. Mgr Krawczyk rozpoczyna prezentację wyników od danych, które nie zostały opublikowane, a mianowicie charakterystyki oddziaływania wybranych archeonów halofilnych na komórki dendrytyczne izolowane od zdrowych dawców krwi. Doktorant w sposób klarowny wskazuje na wnikanie wybranych archeonów do komórek dendrytycznych, które wydają się lokalizować zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym. Nie powodują one jednak istotnych zmian w zakresie kondensacji chromatyny (co może wynikać z ograniczeń zastosowanej metody). Nie zaobserwowano również zmian w zakresie fragmentacji chromatyny, występowania jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA oraz zgodnie z oczekiwaniem w zakresie cyklu komórkowego w porównaniu do komórek dendrytycznych niestymulowanych. Również ilość komórek apoptotycznych po stymulacji komórek dendrytycznych wybranymi archeonami halofilnymi nie ulegała istotnej zmianie.

W drugim podrozdziale mgr Krawczyk opisuje wyniki uzyskane podczas oceny ekspresji receptorów powierzchniowych komórek dendrytycznych stymulowanych wybranymi archeonami halofilnymi oraz oceny poziomów wybranych cytokin. W rozdziale trzecim natomiast opisuje wyniki analiz odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4+ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi pre-edukowanymi wybranymi archeonami halofilnymi. Wyniki obu wyżej wymienionych podrozdziałów rozprawy zostały opublikowane w pracy oryginalnej stanowiącej integralną część dysertacji. Chciałbym zauważyć, że Doktorant przedstawia opis

wyników w języku polskim, niezależnie od załączonego manuskryptu oraz uzupełnia uzyskane wyniki porównując zdolności archeonów halofilnych w formie żywej oraz lizatów komórkowych do stymulacji komórek dendrytycznych. Doktorant prezentuje wyniki z trzech niezależnych powtórzeń. Odstępuje jednak od wykonania analiz statystycznych uzyskanych wyników, co w sposób znaczący utrudnia wyciągnięcie wniosków.

W podrozdziale czwartym mgr Krawczyk opisuje nieopublikowane wyniki oceniające właściwości protekcyjne wybranych archeonów halofilnych wobec komórek dendrytycznych przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B *S. aureus*. Doktorant nie zaobserwował zmian w poziomie kondensacji chromatyny, co jak już zauważyłem wcześniej może wynikać z ograniczeń zastosowanej metody. Zaobserwował natomiast, że SEB powoduje zwiększoną fragmentację chromatyny. Dodanie archeonów halofilnych do hodowli działało protekcyjnie na komórki dendrytyczne powodując istotne obniżenie fragmentacji chromatyny w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie SEB. Podobnie w zakresie jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA zaobserwowano protekcyjne działanie badanych archeonów halofilnych w porównaniu do stymulacji enterotoksyną B. W kolejnej sekcji tego podrozdziału Doktorant opisuje wyniki analiz cyklu komórkowego. Zaobserwowano obniżenie odsetka komórek w fazie SubG1 cyklu komórkowego (potencjalnie komórek apoptotycznych) w obecności SEB oraz analizowanych archeonów halofilnych w porównaniu do komórek stymulowanych samą toksyną. Obserwacja ta została następnie potwierdzona z wykorzystaniem zestawu do oceny apoptozy. Ponadto, zastosowanie wybranych archeonów halofilnych obniżało odsetek komórek w fazie S cyklu w porównaniu do komórek stymulowanych samym SEB. Nie zaobserwowano różnic w fazie G1 oraz G2 cyklu komórkowego. Ta część wyników jest niezwykle zaskakująca. Powszechnie uznaje się bowiem, że komórki dendrytyczne nie proliferują. Nieliczne raporty, które wskazują na takie aktywności, dotyczą komórek progenitorowych pochodzenia szpikowego. Dlatego prosiłbym o komentarz do tej części przeprowadzonych badań.

W podrozdziale piątym mgr Krawczyk opisuje wyniki przeprowadzonej oceny wpływu analizowanych archeonów halofilnych na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T CD4+ przez komórki dendrytyczne w obecności SEB. Doktorant zaobserwował podwyższenie ekspresji analizowanych molekuł kostymulujących CD80, CD83 oraz CD86 oraz odsetka komórek dendrytycznych wykazujących ich ekspresję we wszystkich analizowanych warunkach w porównaniu do kontroli badania. Obecność archeonów

nie powodowała istotnych różnic w porównaniu do komórek stymulowanych samym SEB. Nie zaobserwowano różnic w zakresie poziomu ekspresji CD40, HLA-DR, TLR2, TLR4 oraz DC-SIGN oraz odsetka komórek dendrytycznych wykazujących ich ekspresję. W zakresie analizowanych cytokin uwalnianych do nadsącza hodowlanego przez komórki dendrytyczne zaobserwowano istotnie podwyższone stężenie IL-12p40, IFN γ , IL-10 oraz TNF we wszystkich analizowanych warunkach hodowlanych w porównaniu do próby niestymulowanej. Archeony halofilne nie wpływały na poziom uwalnianych cytokin w obecności SEB w porównaniu do komórek stymulowanych samym superantygenem. Podobnie w nadsączach znad ko-hodowli komórek dendrytycznych i limfocytów T CD4+ zaobserwowano podwyższenie stężenia IL-12p40, IFN γ , TNF, IL-10, IL-13 w porównaniu do komórek niestymulowanych. Również w tym przypadku nie wykazano aktywności immunomodulujących analizowanych archeonów halofilnych.

Sposób prezentacji wyników w całym rozdziale czwartym jest przejrzysty. Legendy załączonych rycin pozwalają na zrozumienie wszystkich zaprezentowanych danych. Świadczy to o wysokiej świadomości Doktoranta. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na powtarzające się zdjęcia kontroli na rycinie 13 oraz 24, a także 15 i 26 (są one identyczne). Doktorant wskazuje na 4 niezależne powtórzenia eksperymentu, stąd można byłoby spodziewać się, że wszystkie warunki eksperymentalne były powtarzane w sposób niezależny w obu częściach wykonanych prac. Sugerowałbym również zastosowanie tych samych powiększeń we wszystkich reprezentatywnych zdjęciach, co ułatwia ich interpretację. Ponadto, podczas prezentowania danych cytometrycznych dobrą praktyką jest załączenie reprezentatywnych cytogramów, co pozwala na dodatkową weryfikację danych.

Rozdział piąty to podsumowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do postawionych celów. Podsumowanie pracy stanowią 3 wnioski, odpowiadające na założony cel badań. Wnioski są trafnie sformułowane i poparte uzyskanymi wynikami przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

Wyniki zostały omówione wyczerpująco w szerokiej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Pana mgr Krzysztofa Krawczyka, jego dojrzałości naukowej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem niezwykle ciekawym, aktualnym, oryginalnym i inspirującym do dalszych badań. Wskazane w recenzji nieliczne błędy edycyjne oraz uwagi, które wymagają

doprecyzowania, nie wpływają na jakość merytoryczną uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko.

Niniejszym stwierdzam, iż przygotowana przez Pana mgr Krzysztofa Krawczyka rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w Dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Krawczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na oryginalność przeprowadzonych badań, wysoki poziom merytoryczny pracy, wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych, a także fakt opublikowania częściowych wyników pracy w wiodącym czasopiśmie z zakresu immunologii (punktacja MEiN 140 pkt) składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Białystok, 16.03.2023

dr hab. Andrzej Eljaszewicz

