

*Akceptuję*  
*[Signature]*

**Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński**  
**KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ**  
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Chodźki 4a  
20-093 Lublin

Tel. (0-81) 448 64 20

fax (0-81) 448 64 21

e-mail: jacek.rolinski@gmail.com

Lublin dn. 30.04.2023r.

**Ocena**

**rozprawy doktorskiej lek. Michała Janysta zatytułowanej: „Zdolność wybranych leków i immunomodulatorów do indukowania limfocytów T regulatorowych (Treg) człowieka – badanie porównawcze” wykonanej w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Promotorem pracy jest prof. dr hab. n. med. Witold Lasek**

Komórki regulatorowe Treg to jedna z najmniejszych subpopulacji limfocytów występująca we krwi obwodowej u ludzi. Stanowią one mniej niż 5% limfocytów pomocniczych T CD4+. Opisane po raz pierwszy przez Gershona i Kondo, na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku jako subpopulacja komórek mająca zdolność hamowania funkcji innych komórek immunokompetentnych. Dopiero w 1995 roku Sakaguchi i wsp. scharakteryzowali fenotyp tych komórek, stwierdzając, że są limfocyty T pomocnicze, które wykazują ekspresję łańcucha  $\alpha$  IL-2 (CD25). Wykazali także że są to komórki odpowiedzialne za hamowanie autoimmunizacji u myszy. Limfocyty pomocnicze CD4+CD25+ zostały nazwane komórkami regulatorowymi (Treg) i stały się w ciągu ostatnich lat jedną z częściej badanych subpopulacji limfocytów człowieka. Odkrycie, że komórki te są istotnym elementem tolerancji obwodowej, przyczyniła się do lepszego poznania patogenezy chorób autoimmunologicznych, alergicznych, a także immunologii

przeszczepów. Limfocyty Treg szybko stały się narzędziem wykorzystywanym do indukcji tolerancji zarówno w modelach doświadczalnych, jak i pierwszych próbach terapeutycznych u ludzi. Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach dotyczących tolerancji immunologicznej i roli limfocytów T regulatorowych w przebiegu różnych chorób, mechanizmy ich działania nie zostały do końca poznane, dlatego też podjęcie przez Doktoranta badań oceniających zdolności wybranych leków i immunomodulatorów do indukowania limfocytów T regulatorowych uważam za w pełni uzasadnione.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Michała Janysta zatytułowana: „Zdolność wybranych leków i immunomodulatorów do indukowania limfocytów T regulatorowych (Treg) człowieka – badanie porównawcze” liczy 107 stron maszynopisu i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Dysertacja składa się z następujących części: spis treści, wykaz używanych skrótów, streszczeń: w języku polskim i angielskim oraz rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, i Piśmiennictwo. Na przeprowadzenie badań Doktorant uzyskał finansowanie z dwóch źródeł: „Diamentowy Grant” Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej pod tytułem: „Badanie wpływu wybranych leków i immunomodulatorów na aktywność limfocytów T regulatorowych (Treg)” oraz mini Grant Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod tytułem: „Badanie wpływu kwasu masłowego na limfocyty T regulatorowe człowieka”.

Należy podkreślić, że część wyników badań z rozprawy została już opublikowana w czasopiśmie posiadającym współczynnik wpływu Impact Factor (IF) i znajdującym się w bazie Journal Citation Reports (JCR): *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 68 (4), art. 20, 2020.

We Wstępie liczącym 15 stron, Doktorant opisał komórki T regulatorowe i ich funkcje następnie scharakteryzował poszczególne subpopulacje tych limfocytów. W kolejnych podrozdziałach przedstawił mechanizmy działania limfocytów T regulatorowych oraz ich

fenotyp. Na zakończenie rozdziału omówił możliwości wykorzystania tych komórek w terapii adoptywnej oraz znaczenie kliniczne Treg indukowanych *in vitro*. Wstęp został napisany jasnym, zrozumiałym językiem i stanowi dobre wprowadzenie do dalszych części pracy.

„Założenia i cele pracy” przedstawione zostały w kilku punktach w sposób logiczny i przekonujący uzasadniają wybór tematu badań. Zakreślone cele są nowatorskie oraz bardzo istotne z punktu widzenia poznawczego, a potencjalnie także klinicznego.

W części „Materiały i metody” Doktorant opisał metodę generacji limfocytów T regulatorowych *in vitro* oraz scharakteryzował ich fenotyp, funkcje oraz wpływ wybranych leków i immunomodulatorów na indukowane „*in vitro*” limfocyty T regulatorowe. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on bardzo nowoczesny, adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o dobrym przygotowaniu praktycznym Doktoranta do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki” Doktorant omówił część pilotażową badań będącą wstępem do dalszych doświadczeń. W kolejnym etapie lek. Michał Janyst scharakteryzował zdolność wybranych leków i immunomodulatorów do generacji limfocytów Treg „*in vitro*”. Wykazał między innymi, że zarówno Rapamycyna jak i prednizolon istotnie zwiększały ekspresję FOXP3 w populacji limfocytów T CD4+ i było to zależne od zastosowanych stężeń tych leków. W przypadku Rapamycyny w stężeniu 100 ng/ml oraz prednizolonu w stężeniu 25 µg/ml indeks MFI FOXP3 wzrastał ponad 2-krotnie w porównaniu do kontroli. Kolejne badane substancje: octan glatiramery w stężeniu 125 µg/ml, maślanu sodu w stężeniu 100 µM, oraz pranobeks inozyliny w stężeniu 200 mg/ml istotnie zwiększały odsetek iTreg, natomiast z wyjątkiem maślanu sodu nie wpływały istotnie na MFI FOXP3. Ekspresja FOXP3 zwiększała się w sposób istotny w przypadku maślanu sodu w stężeniu 100 µM. W przypadku atorwastatyny i octanu sodu Doktorant nie wykazał

istotnego ich wpływu na zwiększenie odsetka limfocytów iTreg w hodowlach ani na zwiększenie ekspresji FOXP3 w populacji limfocytów T CD4+.

Kolejnym etapem badań była ocena odsetka komórek z ekspresją CTLA-4 i GITR na limfocytach T regulatorowych indukowanych „*in vitro*” w hodowli o różnych stężeniach leku lub immunomodulatora. Dodatek do hodowli pranobeksu inozyny, maślanu sodu, rapamycyny oraz prednizolon prowadził do obniżenia odsetka limfocytów CD4+CTLA-4+. Efekt ten był największy w hodowlach z prednizolonem. Natomiast Doktorant nie wykazał istotnego statystycznie wpływu badanych związków na odsetek komórek CD4+GITR+ ani na ekspresję CTLA-4 i GITR na limfocytach T CD4+.

Istotną częścią badań była ocena zdolności limfocytów iTreg, pozyskanych z hodowli z rapamycyną i prednizolonem, do hamowania odpowiedzi immunologicznej - badania oceniające funkcję limfocytów iTreg (test mieszanej hodowli limfocytów – MLR) oraz zahamowania stymulacji z zastosowaniem limfocytów efektorowych znakowanych CFSE. Doktorant, wykazał silniejsze działanie prednizolonu niż rapamycyny na supresyjną aktywność limfocytów iTreg. Prednizolon również istotnie zmniejszał wydzielanie badanych cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-6).

Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest siedem wniosków, z których najistotniejszy wg recenzenta wydaje się wniosek 7: „Prednizolon mógłby być alternatywą w protokołach otrzymywania limfocytów T regulatorowych do zastosowania w celach terapeutycznych”. Zawarte w pozostałych wnioskach stwierdzenia mają pełne pokrycie w wynikach badań i dowodzą realizacji przez Doktoranta celów pracy. Wydając końcową opinię o rozprawie doktorskiej, stwierdzam, że rozprawa napisana została z wszechstronną znajomością omawianych problemów a dobór technik badawczych, jak i przeprowadzone doświadczenia, uzyskane wyniki oraz ich analiza statystyczna nie budzą zastrzeżeń. Badania wykonane przez Doktoranta przyniosły szereg ważnych obserwacji, niezwykle istotnych dla

lepszego poznania wpływu badanych leków i immunomodulatorów na generacje i działanie limfocytów Treg. Dyskusja oraz wnioski kończące prace dowodzą wysokich umiejętności i dociekliwości Doktoranta oraz zachęcają do kontynuacji badań. Doktorant wykazał się dojrzałością naukową i udowodnił umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań, ich realizacji z doбором odpowiednich metod oraz krytycznej i rzetelnej analizy poczynionych obserwacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Michała Janysta zatytułowana: „Zdolność wybranych leków i immunomodulatorów do indukowania limfocytów T regulatorowych (Treg) człowieka – badanie porównawcze” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje teoretyczną wiedzę Doktoranta w zakresie immunologii. Tym samym rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych, WUM o dopuszczenie lek. Michała Janysta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
*prof. dr hab. n.med. Jacek Rolinski*

