



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 16.05.2023r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Michała Janysta,
zatytułowanej:**

**Zdolność wybranych leków i immunomodulatorów do indukcji limfocytów
Tregulatorowych (Treg) człowieka- badania porównawcze**

Praca doktorska lekarza Michała Janysta została wykonana w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. n. med. Witold Lasek.

Tematyka ocenianej pracy dotyczy limfocytów T regulatorowych, jednych z ważniejszych komórek odpowiedzialnych za rozwój i utrzymanie tolerancji immunologicznej. Nieprawidłowe działanie limfocytów T regulatorowych może prowadzić do rozwoju wielu chorób. W piśmiennictwie opisywane są dwa główne kierunki badań nad wpływem leków na rozwój i funkcję limfocytów Treg, jedna z nich to badania *in vitro*, poznawcze, ale również przygotowanie komórek do eksperymentalnej terapii adoptywnej i druga, to ocena jak przyjmowane przez pacjentów leki wpływają na rozwój i funkcję limfocytów Treg w ich organizmach. W przypadku pierwszego kierunku badań ważna jest optymalizacja warunków pozyskiwania iTreg do zastosowania w terapii adoptywnej. W przypadku drugiego kierunku, wiedza czy poprzez podawanie określonych leków można wpływać na potencjał limfocytów Treg w organizmie, tych już obecnych i tych powstających w ich obecności.

W ten nurt poszukiwania optymalnych warunków rozwoju limfocytów T regulatorowych i ich potencjalnego zastosowania w eksperymentalnych terapiach wpisują się badania prowadzone przez lekarza Michała Janysta. Podjął się zadania oceny wpływu wybranych leków i immunomodulatorów w rozwoju i funkcji indukowanych w warunkach *in vitro* limfocytów T regulatorowych (iTreg). Należy uznać tę inicjatywę za ważne poznawczo zadanie naukowe z potencjałem aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska Pana Michała Janysta przedstawiona została w postaci manuskryptu, zawierającego 107 stron i podzielonego na typowe dla tego rodzaju dysertacji rozdziały.

Wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki rozwijanej w rozprawie, opartym na przeglądzie wielu, ponad 200, pozycji z literatury przedmiotu i może stanowić podstawę do przygotowania publikacji przeglądowej, przedstawiającej najnowszą wiedzę dotyczącą limfocytów T regulatorowych i ich zastosowania w terapii. Stanowi dobre wprowadzenie do postawienia celów badawczych, a wybór publikacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktoranta w tematyce.

W oparciu o aktualną wiedzę, Doktorant określił cel badawczy, którym była ocena zdolności wybranych leków i immunomodulatorów do indukowania limfocytów Treg człowieka w warunkach *in vitro*. Przedstawił też szczegółowe cele badawcze.

Lek. Michał Janyst zastosował w swojej pracy szereg metod z zakresu biologii komórki i cytometrii przepływowej, które dokładnie opisano. Przedstawiono również założenia i schematy przeprowadzonych analiz, co czyni pracę przejrzystą i dopracowaną metodologicznie. Na uwagę zasługuje dobra dokumentacja wyników. Prawidłowo zostały dobrane testy laboratoryjne i odpowiednie kontrole. Analiza i ocena wyników badań świadczy o dobrym opanowaniu przez doktoranta metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazują na Jego dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć wykazanie, że rapamycyna i prednizolon zwiększają rozwój limfocytów T regulatorowych *in vitro*, indukowanych w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28, w obecności TGF- β . Również inne badane immunomodulatory, jak maślan sodu, octan glatiramery czy pranobeks inozyny wykazywały, zależny od stężenia, efekt stymulujący. Jednakże, rapamycyna i prednizolon powodowały najsilniejsze działanie stymulujące. Nasuwa się pytanie, co skłoniło Doktoranta do wyboru tych leków i immunomodulatorów? Czym się kierował wybierając ich stężenia? Czy sprawdzano jak obecność obu leków w środowisku, rapamycyny i prednizolonu, wpływa na proces rozwoju limfocytów iTreg w porównaniu do obecności pojedynczych?

W testach oceniających funkcję indukowanych *in vitro* limfocytów T regulatorowych Doktorant wykazał silniejsze działanie rapamycyny i prednizolonu, zwiększające supresyjne właściwości uzyskanych limfocytów iTreg, niż było to widoczne w obecności innych immunomodulatorów. Zaobserwował, że limfocyty Treg indukowane w obecności

prednizolonu silniej hamowały proliferację komórek efektorowych, niż te indukowane w obecności rapamycyny.

Inna ciekawa obserwacja dotyczy hamującego działania prednizolonu na wydzielanie cytokin prozapalnych, a konkretnie TNF- α i IL-6, przez indukowane limfocyty T regulatorowe *in vitro*, co może być istotne w stabilizacji fenotypu i w konsekwencji przy zastosowaniu w terapii adoptywnej.

Wyniki badań skłaniają lekarza Michała Janysta do stwierdzenia, że istnieje możliwość wykorzystania ich, jako alternatywy do rapamycyny, w protokołach otrzymywania limfocytów Treg do zastosowania w celach terapeutycznych. Jest to ważna obserwacja, którą należy potwierdzić w dalszych badaniach. Rola rapamycyny jest już dobrze udokumentowana w piśmiennictwie i zastosowaniu laboratoryjnym w przygotowaniu limfocytów iTreg do terapii, natomiast niewiele jest danych odnośnie roli prednizolonu w rozwoju limfocytów Treg. Inną gałęzią badań jest analiza, jak leki, szczególnie o działaniu immunosupresyjnym, wpływają na rozwój limfocytów Treg w organizmie osób przyjmujących je. Czy Doktorant mógłby porównać, na podstawie dostępnych informacji, działanie rapamycyny i prednizolonu na rozwój i funkcję limfocytów Treg *in vivo*? Czy również obserwuje się podobny efekt jak *in vitro*?

Uzyskane wyniki zostały omówione na tle dostępnej wiedzy. Dyskusja napisana jest dojrzałe i przejrzyste. Doktorant odnosi się do obszernego piśmiennictwa, konfrontuje własne wyniki z obserwacjami innych badaczy. Po dyskusji zamieszczono podsumowanie, podkreślające najważniejsze osiągnięcia.

Dysertacja napisana została starannie, lekarz Michał Janyst w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza nielicznymi literówkami czy niezręcznymi sformułowaniami.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską lekarza Michała Janysta pozytywnie. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego wykonywania pracy naukowej. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktoranta w zakresie prowadzonych badań.

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.).

Tym samym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Michała Janysta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy. Doktorant wykazał się szeroką znajomością tematu, umiejętnością samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych oraz znajomością i opanowaniem nowoczesnych technik laboratoryjnych. Posiada również umiejętność zdobywania środków finansowych na swoje badania, jak również publikowania uzyskanych rezultatów.



prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska