

Katowice, 30.03.2017 r.

Ocena

**rozprawy doktorskiej lekarza Krystyny Okoniewskiej z Katedry Farmakologii
i Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

**z tytułu: „Selekcja *in silico* oraz weryfikacja *in vitro* aktywności nowych
tregitopów – polipeptydów o działaniu tolerogennym”**

Klinika
Chorób Wewnętrznych
i Farmakologii
Klinicznej Katedry
Farmakologii

40-752 Katowice,
ul. Medyków 18
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY i KLINIKI
prof. Bogusław Okopień
bokopien@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KATEDRY
tel.: +48 32 252 39 02
fax: +48 32 288 85 32
farmklin@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KLINIKI
tel.: +48 32 789 43 40
fax: +48 32 789 43 43
kfa3@uck.katowice.pl

Układ rozprawy składającej się ze 139 stron jest typowy i składa się ona ze wstępu, wyodrębnionych założeń i celu pracy, opisu modelowania matematycznego, przebiegu hodowli komórkowej i zastosowanych procedur badawczych, prezentacji uzyskanych wyników oraz dyskusji zamkniętej wnioskami.

W treści pracy Autorka powołuje się na 132 pozycje precyzyjnie dobrane aktualnego piśmiennictwa w dużej mierze z ostatnich lat. Ponadto rozprawa zawiera 26 rycin i 10 tabel dobrze dokumentujących podstawy badania, układ eksperymentu, jak i uzyskane wyniki. Dla lepszej orientacji czytelnika zamieszczono również wykaz skrótów oraz spis dokumentacji, natomiast streszczenia w języku polskim i angielskim zamieszczono na początku pracy.

Głównym zagadnieniem dysertacji Pani Krystyny Okoniewskiej jest znalezienie związku pomiędzy budową chemiczną nowych peptydów tolerogennych a ekspresją epitopów znacznikowych komórek T regulatorowych oraz wydzielaniem interleukiny-10. Autorka zrealizowała ten cel w trzech etapach poszukując odpowiednich peptydów, sprawdzając ich działania w doskonalonych modelach oraz indukując proliferację limfocytów T regulatorowych.

Doktorantka oparła się na swoich wcześniejszych badaniach wykorzystując model selekcji tregitopów badając zależność pomiędzy budową chemiczną peptydów a siłą wiązania z elementami głównego

układu zgodności tkankowej (Okoniewska i wsp.: Relationship between treptopes structure and binding with Major Histocompatibility Complex class I. *Drug Research* (Stuttgart) 2015,65:1-6). Natomiast biosyntezy peptydów poddawanych weryfikacji *in vitro* dokonano w GeneCust Europe Laboratoire de Biotechnologie du Luxembourg S.A. Placówka ta ma ugruntowaną pozycję w wytwarzaniu i oczyszczaniu peptydów, siRNA, digonukleotydów, przeciwciał, genów, adenowirusów oraz najnowszych procedurach biologii molekularnej. Kandydatka na wstępie dokładnie przedstawia uwarunkowania chorób z autoagresji, koncentrując się szczególnie na roli komórek T regulatorowych w mechanizmie odpowiedzi immunologicznej. W ten sposób płynnie przechodzi do złożonych mechanizmów udziału treptopów w procesie tolerancji odpornościowej. Mechanizmy te umiejętnie łączy z funkcjami przeciwciał IgG w immunomodulacji poprzez interakcje antyidiotypowe, w hamowaniu zależnego od dopełniacza procesu niszczenia tkanek czy w indukowaniu naturalnych komórek T regulatorowych. Zwraca uwagę doskonałą znajomością roli treptopów w fizjologicznej i nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Ciekawie opisuje potencjalne znaczenie tych krótkich sekwencji aminokwasowych dla terapii chorób z autoagresji, czy optymalizacji sekwencji szczepionek i przeciwciał monoklonalnych. Wreszcie co jest zupełnie zgodne z logiką wywodu czytelnik znajduje omówienie aktualnych kierunków badań poświęconych ustaleniu funkcji i możliwych praktycznych sposobów wykorzystania treptopów.

W oparciu o interesujący wstęp Autorka formułuje cel pracy ustalając zarazem kolejność wykonywania czynności badawczych. Warto dostrzec, że dla stworzenia matematycznego modelu selekcji treptopów pochodzenia naturalnego wybrano 16 sekwencji aminokwasowych IgG, z których do weryfikacji funkcjonalnej wyselekcjonowano 8 treptopów.

Wytypowano także dwa dodatkowe peptydy jako kontrole, pozytywną i negatywną. Opis zastosowanych metod badawczych jest skrupulatny i uporządkowany. Matematycznie poszukiwano zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi sekwencji aminokwasów a zdolnością

do hamowania receptorów głównego układu zgodności tkankowej. Po przeprowadzeniu walidacji analizowano fizjologiczną funkcję typowych trepitopów oraz ich potencjalny udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej na podstawie danych bazy UniProtKB (UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Research. 43(Database issue):D204-12. 2015, doi: 10.1093/nar/gku989; UniProt KB <http://www.uniprot.org/> dostęp do informacji zawartych w bazie danych pomiędzy 01-06-2016 a 01-06, 2016.). Finalnie opracowano kryteria włączenia do grupy peptydów weryfikowanych *in vitro*. Dla odpowiedniego ich rozpuszczenia określono wypadkowy ładunek cząsteczek.

Następnie opisano dokładnie grupę myszy doświadczalnych, pobieranie próbek krwi oraz fragmentów śledziony. Pani Krystyna Okoniewska detalicznie przedstawia techniki izolacji i sortowania komórek, zakładanie ich hodowli oraz metody barwienia. Wykorzystano nowoczesne procedury cytometrii przepływowej i rezonansu plazmonów powierzchniowych.

W analizie statystycznej oceniono rozkład danych, a następnie wykorzystano odpowiednie testy.

Wyniki zaprezentowano na dwudziestu ośmiu stronach przeplatając je rycinami i tabelami co znakomicie ułatwiło zapoznanie się recenzenta z uzyskanymi danymi liczbowymi. Proliferację komórek T regulatorowych naturalnych i indukowanych udokumentowano fotograficznie (ryc. 14 wg porządku z tab. 5)

Przeprowadzona przez Panią Krystynę Okoniewską dyskusja jest wyczerpująca i ścisła. Autorka bardzo dobrze wiąże swoje obserwacje z umiejętnie dobranym aktualnym piśmiennictwem. Chronologia prowadzonego dyskursu dokładnie odpowiada biegowi wykonanego eksperymentu. Ten porządek jest ważny, bowiem pozwala zachować logiczny ciąg interpretacji uzyskanych wyników. Ponadto Kandydatka tłumaczy te, a nie inne decyzje metodyczne, wiąże szczep wybranych myszy z zastosowaną techniką badawczą, tłumaczy zawilości dociekań matematycznych oraz poszukiwania własnych aranżacji procedur

badawczych. Dyskusje kończy wyczerpujące podsumowanie oraz wnioski odpowiadające założonym celom rozprawy.

Praca jak można było oczekiwać jest wartościową kontynuacją kierunku badań Promotora, Pana docenta Tomasza Grabowskiego nad przeniesieniem własności fizykochemicznych badanej budowy leków i ich gromadzenia w tkankach na wzory algebraiczne (Grabowski T, Jaroszewski JJ, Gad S.C., Feder M. Correlation between *in silico* physiochemical characteristics of drugs and their mean residence time in human and dog. International Journal of Toxicology. 2012; 31(1):25-33).

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia trudne do wyeliminowania przy opracowaniu skomplikowanego materiału i nie umniejszające wartości pracy.

Rozdział dotyczący metodyki badań laboratoryjnych jest napisany bardzo szczegółowo i zawiera wszystkie niezbędne informacje o stosowanych procedurach. Recenzent uważa, że niektóre z informacji można było nawet pominąć bez straty dla wartości merytorycznej pracy. Dotyczy to np. rozdziału 8.7. „Synteza peptydów badanych *in vitro*” wraz z ryciną 6. Rozdział ten zawiera bowiem informacje dotyczące *stricte* technicznych aspektów procesu syntezy chemicznej i wykracza poza główny temat doktoratu.

Na stronie 29 i dalszych, przy omawianiu procesu selekcji potencjalnie aktywnych cząsteczek polipeptydów Autorka zakłada trzy kolejne aminokwasy jako minimalną długość motywu agregacyjnego. Powstaje więc pytanie dlaczego dokonano wyboru takiego parametru, czy trzy aminokwasy (czyli 9 kodonów mRNA) mają wystarczający potencjał selekcyjny i czy nie powstaje ryzyko wyboru sekwencji przypadkowych? Ponieważ epitopy Treg wykazują charakter konserwatywny, to czy możliwe było wybranie dłuższego motywu aminokwasowego do procesu selekcji?

Doktorantka powołuje się na dostęp do bazy danych UniProtKB jedynie w dniu 01.06.2016 (poz. 118) czy tak było rzeczywiście?

W rozdziale 8.8. „, Peptydy badane *in vitro*, rozpuszczalność i przygotowanie do badań”, Autorka zaznacza, że poszczególne peptydy były

rozpuszczane w różnych roztworach, zależnie od wypadkowego ładunku cząsteczek (Tabela 2.). Recenzent zdaje sobie oczywiście sprawę, że rozpuszczalność peptydów w roztworach wodnych, zazwyczaj niezbędna w badaniach biologicznych, stanowi istotny problem. Czy można mieć pewność, że udział takich rozpuszczalników organicznych jak acetonitryl, kwas trifluorooctowy lub dimetylosulfotlenek pozostaje bez wpływu na uzyskiwane wyniki? Czy są jakieś publikowane wcześniej prace wykluczające tę możliwość?

W rozdziale Wyniki, Rycina 15 na stronie 62 brak jest opisu na osi OX na obu wykresach.

W syntetycznie przeprowadzonej dyskusji Doktorantka unika zbędnych dłużyzn, ale uzyskane nowatorskie wyniki zobowiązują do przedstawienia koncepcji dalszych badań.

Powołując się na swoje własne prace Autorka parokrotnie wspomina o publikacji z 2016 r. (str. 25, str. 26, str. 27 dwa razy, str. 28). Tymczasem w piśmiennictwie pod pozycją nr 90 znajduje się jedynie praca z 2015 roku.

Brak też wyosobnionego fragmentu poruszającego problem ograniczeń niniejszej dysertacji. Nawet najlepsza praca może z takimi ograniczeniami powstać, a zdolność krytycznego spojrzenia na własne osiągnięcia to trudny, a zarazem ważny dowód dojrzałości naukowej.

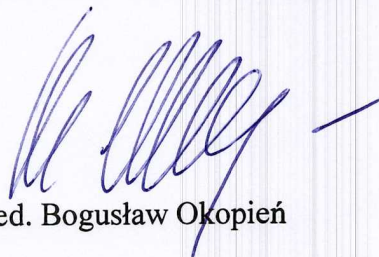
W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została dobrze wykonana. Wnosi ona ważne i nowe informacje do naszej wiedzy na temat możliwości projektowania, produkowania i weryfikacji tregitopów w celach badawczych i przedklinicznych. Otrzymane wyniki mogą zaowocować planami prób klinicznych w celu terapeutycznego zastosowania nowych cząsteczek.

Autorka poprawnie opracowała różnorodny i nowoczesny metodyczny warsztat naukowy oraz wykazała się umiejętnością opracowania i interpretacji otrzymanych obszernych danych eksperymentalnych.

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.)

**Zatem mam zaszczyt przedstawić
Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
wniosek o dopuszczenie
Pani Krystyny Okoniewskiej do dalszych etapów przewodu
doktorskiego.**

**Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie ocenionej pracy po
spełnieniu wymogów formalnych.**



Prof. dr hab. n. med. Bogusław Okopień