



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii



Prof. dr hab. Nadzieja Drela  
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii  
Zakład Immunologii  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
ndrela@biol.uw.edu.pl  
Tel: 22 5541126  
Kom. 608 679 011

Warszawa, 14.08.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Curzytek pt.**

**„Badanie wpływu leków przeciwdepresyjnych na przebieg reakcji nadwrażliwości kontaktowej w modelach zwierzęcych i z zastosowaniem linii komórkowych HaCaT i JAWSII”**

Rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

Prof. dr hab. Marta Kubera

Według danych WHO z 30 stycznia 2020 roku, depresja zaliczana jest do powszechnych zaburzeń psychicznych. Cierpi na nią ponad 264 miliony ludzi, w tym częściej kobiety, prowadzi często do samobójstwa, głównie w grupie pacjentów między 15 i 29 rokiem życia. Jest jednym z priorytetowych schorzeń objętych programem działań Światowej Organizacji Zdrowia. Uznaje się, że leki przeciwdepresyjne mogą być skuteczne w terapii umiarkowanej i ciężkiej depresji. Uważa się, zgodnie z najstarszą hipotezą, że w regulacji nastroju biorą udział trzy podstawowe monoaminy, które działają jak neuroprzekaźniki: dopamina, noradrenalina i serotonina. Ich dostępność w mózgu osób z depresją jest mała, a leki przeciwdepresyjne działają poprzez zwiększenie dostępności jednego lub paru z nich.

Zainteresowanie zaburzeniami psychicznymi wykroczyło poza dziedzinę psychologii i nauki medyczne, gdy okazało się, że mają one związek z ogólnym stanem zdrowia i wpływają na funkcjonowanie praktycznie wszystkich układów organizmu. Krokami milowymi w interdyscyplinarnym podejściu do chorób psychicznych i ich związku z aktywnością układu

odpornościowego stały się wyniki badań, które wskazały na rolę: a/ interakcji między układem nerwowym, hormonalnym i odpornościowym z udziałem pętli regulatorowych podwzgórze-przysadka-nadnercza, podwzgórze-przysadka-gonady i podwzgórze-przysadka-tarczyca; b/ krążenia limfatycznego w mózgu, którego obecność wykryto w 2015 roku; c/ mikrobioty jelitowej. Ze względu na wielopoziomowe interakcje, problematyka badawcza podjęta przez Autorkę rozprawy doktorskiej, panią mgr Katarzynę Curzytek, jest trudna, wielowątkowa i bardzo ważna zarówno w kontekście badań podstawowych jak i aplikacyjnych.

#### Ocena merytoryczna dysertacji

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 199 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie, Autorka dysertacji zwraca uwagę na przyczyny wzrastającej zachorowalności na kontaktowe zapalenie skóry, wśród których za główną uznaje zanieczyszczenia chemiczne będące skutkiem postępującej industrializacji. Zapewne nie jest to jedyny powód, skoro, jak pisze sama Autorka, w populacji cierpiącej na ACD, jedynie 30% stanowią choroby zawodowe. Następnie, Autorka opisuje znane oraz hipotetyczne mechanizmy patogenezy depresji, znacznie wykraczając poza informację przytoczoną przeze mnie za WHO. Molekularne mechanizmy depresji są ciągle badane. Oprócz niedoboru amin w ośrodkowym układzie nerwowym rozpatruje się rolę komórek układu odpornościowego w indukcji stanu zapalnego, ze szczególnym uwzględnieniem syntezy cytokin prozapalnych, aktywacji osi HPA, zmian neurodegeneracyjnych, które także mogą wynikać z rozwoju stanu zapalnego w mózgu, a stąd już blisko do roli mikrobioty jelitowej, której skład wpływa na aktywność układu odpornościowego i w konsekwencji na funkcjonowanie mózgu. Zasadnicza część wstępu poświęcona jest mechanizmowi reakcji nadwrażliwości kontaktowej w klasycznym ujęciu z opisem fazy indukcyjnej i fazy efektorowej, a także procesom, które występują pomiędzy nimi i dotyczą aktywacji limfocytów T efektorowych w węzłach chłonnych i ich migracji do miejsca stanu zapalnego. Autorka dysertacji, na podstawie najnowszego piśmiennictwa opisuje szczegółowo mechanizm aktywacji limfocytów T z udziałem komórek prezentujących antygen oraz ich różnicowanie w limfocyty T efektorowe reakcji nadwrażliwości kontaktowej (Tc1 i Th1). Przedstawia także udział komórek odporności wrodzonej i innych populacji limfocytów T CD4+ efektorowych, które biorą udział w różnych etapach fazy efektorowej. Mechanizm reakcji nadwrażliwości kontaktowej przedstawiony jest na rycinie 1 w sposób prawidłowy. Jednakże, byłby bardziej czytelny, gdyby linie wskazywały kierunek przebiegu procesu w określonej fazie reakcji, odnoszący się do migracji komórek, interakcji między nimi za pośrednictwem receptorów, czy też wydzielanych mediatorów. Dodatkowo, poza rozwinięciem skrótów, rycina powinna być opatrzona legendą opisującą w skrócie jej zawartość. Brak legend jest charakterystyczny także dla pozostałych rycin przedstawiających schematy. Autorka dysertacji, opisuje w dużym skrócie klasyfikację leków

przeciwdepresyjnych i charakterystykę tych, które zostały zastosowane w realizowanym projekcie badawczym. Nie znajduję we wstępie, ani też w celu pracy, jasno sprecyzowanej hipotezy badawczej wynikającej z przesłanek, dotychczasowych wyników badań podstawowych lub klinicznych. Tytuł rozprawy doktorskiej zawiera informację, że dotyczy ona badania wpływu leków przeciwdepresyjnych na przebieg reakcji nadwrażliwości kontaktowej. Wynika z tego, że ten wpływ jest w ogóle nieznan. Tymczasem w rozdziale „Cel pracy”, Autorka stwierdza, że leki przeciwdepresyjne działają hamująco na CHS, a celem badań jest określenie mechanizmów działania hamującego. Jak sama Autorka pisze, współwystępowanie depresji i alergicznego kontaktowego zapalenia skóry jest wysoce prawdopodobne, na co wskazuje udział stanu zapalnego w rozwoju depresji. Jednak, znane są także doniesienia o zmniejszonej aktywności układu odpornościowego w depresji, a także występowanie chorób skóry wskutek przyjmowania leków przeciwdepresyjnych, w tym fluoksetyny. Czy częste są przypadki złagodzenia objawów klinicznych CHS wskutek przyjmowania leków przeciwdepresyjnych przez pacjentów z depresją? Nadwrażliwość typu IV leży u podłoża wielu chorób autoimmunizacyjnych. Czy stanowi to przesłankę do stosowania leków przeciwdepresyjnych w ich leczeniu? Problem badawczy podjęty przez Autorkę dysertacji jest nowy i bardzo ważny, dlatego tak upieram się przy wnikliwym uzasadnieniu hipotezy badawczej. Pani Katarzyna Curzytek w rozdziale Cel pracy wyszczególnia cele rozprawy, które stanowią raczej etapy badań z wykorzystaniem modeli doświadczalnych *in vivo* i *in vitro*, które, jak wynika z opisu Autorki, mają posłużyć do poznania mechanizmu hamującego działania leków przeciwdepresyjnych na CHS. Ja to widzę nieco odmiennie, a mianowicie: a/ podstawą projektu badawczego jest hipoteza, a celem badań jest jej weryfikacja, b/ cele szczegółowe badań są w rzeczywistości etapami badań, które służą weryfikacji hipotezy badawczej.

Część doświadczalna projektu badawczego, zastosowane modele badawcze z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych i linii komórkowych zostały bardzo starannie zaplanowane. Opisano i przedstawiono schematy badań *in vivo* i *in vitro*. Wybór szczepów myszy umożliwił zbadanie działania zastosowanych leków przeciwdepresyjnych na główne typy limfocytów T biorących udział w fazie efektorowej CHS, limfocyty Th1 i Tc1 oraz roli, wciąż mało znanej, innych limfocytów, T $\gamma$  $\delta$  i NKT, poprzez zastosowanie szczepów „knock-out”. Modele *in vitro*, w których wykorzystano linię komórkową keratynocytów człowieka, HaCaT, oraz linię niedojrzałych komórek dendrytycznych JAWS II myszy umożliwiły zbadanie roli komórek, które trudno jest wyizolować z tkanek prostymi metodami izolacji, a są one bardzo ważne w indukcji reakcji nadwrażliwości kontaktowej. Ponadto, są bardzo dobrym modelem do badania leków na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Zastosowano różnorodne techniki badawcze, od

klasycznych metod analizy aktywności komórek, po metody immunoenzymatyczne, immunocytochemiczne do analizy markerów powierzchniowych oraz techniki biologii molekularnej analizy ekspresji genów i białek. Wszystkie metody zostały opisane bardzo szczegółowo, co umożliwi ich wykorzystanie przez innych badaczy. Dokumentacja uzyskanych wyników jest imponująca i wskazuje na niezwykłą pracowitość i skupienie pani Katarzyny Curzytek podczas przeprowadzania doświadczeń. Wyniki przedstawiono na 37 rycinach i 9 tabelach, a każda z nich zawiera dziesiątki wyników. Dokumentują one, że badane leki przeciwdepresyjne, fluoksetyna i dezypramina, hamują reakcję nadwrażliwości kontaktowej niezależnie od typu limfocytów T odpowiedzialnych za przebieg fazy efektorowej. Hamują syntezę cytokin prozapalnych i stymulują syntezę niektórych cytokin przeciwzapalnych. W procesie hamowania nie uczestniczą limfocyty T $\gamma\delta$ . Wyniki badań z wykorzystaniem linii komórkowych potwierdziły przeciwzapalną aktywność badanych leków przeciwdepresyjnych i wskazały przydatność obu linii w badaniach szlaków sygnałowych w indukcji reakcji nadwrażliwości, a także modulację aktywności komórek prezentujących antygeny przez leki przeciwdepresyjne. Zaplanowane przez Autorkę dysertacji etapy badań z założenia są wielowątkowe, jak się domyślam, także z tego powodu, aby uzyskane wyniki wyłoniły kolejne kierunki badań. Jednakże, wybór niektórych metod, czy też aktywatorów limfocytów budzą moje zastrzeżenia. I tak, jaka jest zdaniem Autorki dysertacji, wartość wyników dotyczących aktywności limfocytów T stymulowanych w hodowlach *in vitro* ConA? Jeżeli używamy mieszaninę leukocytów izolowanych z obwodowych narządów limfoidalnych to skutkiem dodania do hodowli ConA jest aktywacja komórek odporności wrodzonej i nabytej. Dlaczego nie zastosowano czynników aktywujących bardziej wybiórczo chociaż poliklonalnie, które aktywują limfocyty T poprzez symulację warunków fizjologicznych, przynajmniej w przypadku badania proliferacji limfocytów śledziony i węzłów chłonnych? Ponadto, dlaczego metodą z wyboru do analizy proliferacji splenocytów czy limfocytów węzłów chłonnych, był pomiar inkorporacji <sup>3</sup>H-tymidyny zamiast techniki cytometrii przepływowej umożliwiającej analizę liczby rund proliferacyjnych i fenotypu proliferujących limfocytów? Oczywiście, można powiedzieć, że istnieje kilka metod badania proliferacji komórek, a jednak zwykle wybieramy metodę optymalną, którą z pewnością nie jest metoda wykorzystująca radioaktywną tymidynę. Kolejnym, imponującym rozdziałem jest Dyskusja i to nie z powodu liczby stron, chociaż jest ich ponad 40, lecz z powodu jej wnikliwości i oceny własnych wyników na tle dokonań innych zespołów badawczych. Autorka dysertacji wnioskuje bardzo ostrożnie, co świadczy o dojrzałości badacza. Wskazuje na szereg wyników badań kontrowersyjnych i przeciwstawnych, które nadal oczekują na wyjaśnienie. Zaskakująca, w porównaniu ze wstępem, jest obfitość informacji dotyczących przesłanek, czy też uzyskanych przez innych Autorów

wyników badań, które skłoniły Autorkę dysertacji do sformułowania hipotezy badawczej powtórzonej w kilku miejscach dyskusji, podczas gdy brak jej w samym Wstępie i Celu pracy. Zakończeniem dyskusji jest bardzo zwięzły i dobrze napisany rozdział Podsumowanie i wnioski. Rozprawę doktorską kończy wykaz piśmiennictwa zawierający 253 pozycje ściśle związane z tematem dysertacji. Ciekawa jestem opinii pani Katarzyny Curzytek na temat aktualnych hipotez dotyczących etiologii depresji. Czy można łatwo określić czynniki ją wywołujące? Czy pierwotny jest stan zapalny i wynikające z niego objawy depresji? Czy też depresja skutkuje indukcją chorób związanych z lokalnym lub uogólnionym stanem zapalnym? Związek między aktywnością układu odpornościowego i depresją wykazano także w odpowiedzi na infekcje. Sepsa jest uogólnioną odpowiedzią układu odpornościowego na infekcję, a pacjenci wyleczeni wykazują długotrwałe objawy stanu zapalnego i zwiększoną zachorowalność na choroby depresyjne. I na koniec, czy można stosować wskaźniki mierzące aktywność układu odpornościowego do monitorowania przebiegu czy terapii depresji?

#### Uwagi formalne

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na zaniedbania edytorskie, bardzo dużą liczbę błędów literowych, stylistycznych i stosowanie niepoprawnego nazewnictwa, będące skutkiem dosłownego tłumaczenia nazw z języka angielskiego. Wyszczególnię jedynie przykłady tych ostatnich błędów: „komórki T” zamiast limfocyty T, „komórki DC” zamiast komórki dendrytyczne lub po prostu DC (w skrócie DC zawarty jest wyraz „komórka”), „komórki efektorowe T” zamiast limfocyty T efektorowe, „komórki Treg” zamiast limfocyty T regulatorowe, „procesy autoimmunologiczne” zamiast autoimmunizacyjne, „komórki B-1” zamiast limfocyty B-1, „migracja na obwód” zamiast migracja do obwodowych narządów limfoidalnych, czy migracja do tkanek objętych stanem zapalnym (zależnie od kontekstu), niepoprawny zapis „i/lub”, który nie jest odpowiednikiem angielskiego and/or.

Chciałam jednocześnie nadmienić, że napisanie dzieła w formie 199-stronicowej rozprawy doktorskiej, bez zespołu korektorów zwykle dostępnych w wydawnictwach, jest trudnym zadaniem.

#### Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem pani Katarzyny Curzytek zrealizowanym w ramach projektu badawczego finansowanego z grantu PRELUDIUM 7 nr 2014/13/NZ6/00639. Według mojej oceny, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Składam do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Curzytek do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy zatytułowanej „Badanie wpływu leków

przeciwdepresyjnych na przebieg reakcji nadwrażliwości kontaktowej w modelach zwierzęcych i z zastosowaniem linii komórkowych HaCaT i JAWSII”.

Większość wyników zawartych w rozprawie doktorskiej zostało już opublikowanych, a w przygotowaniu jest kolejna publikacja. Spośród 4 opublikowanych prac, pani mgr Curzytek jest pierwszym Autorem 3 nich. Zatem, większość dorobku Autorki dysertacji została już oceniona pozytywnie, a wyniki badań jako interesujące i nowatorskie zostały docenione przez redakcje czasopism naukowych. Niezależnie od rozlicznych niedociągnięć, na które zwróciłam uwagę, najbardziej cenna jest zawartość merytoryczna rozprawy i ze względu na nią wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Katarzyny Curzytek.

Podstawa prawna: Ustawa 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. – tekst ujednolicony D.U. z dnia 2 grudnia 2014 r. poz. 1852) oraz Rozporządzenie MNiSzW z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Nadzieja Melo