

Recenzje pomyślne
wniosek o wyrażenie
M. Paunowicz



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
ZAKŁAD MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ I IMMUNOREGULACJI

Białystok, 11 Lipca 2022

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
pt. „Znaczniki aktywacji limfocytów płynu stawowego w reumatoidalnym zapaleniu stawów.
Modyfikacja pod wpływem leczenia”
mgr Eweliny Wędrowskiej
pod kierunkiem dr hab. n. med. Piotra Kopińskiego, prof. UMK

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęściej występujących układowych chorób zapalnych tkanki łącznej. RZS występuje 2-3 razy częściej u kobiet niż u mężczyzn niezależnie od wieku. Choroba rozwija się przez całe życie, początkowo bezobjawowo, a manifestacja kliniczna przypada zazwyczaj pomiędzy trzecią a szóstą dekadą życia. Patofizjologia RZS obejmuje: 1) utratę zdolności tolerancji na antygeny własne przez osoby predysponowane genetycznie; 2) autoimmunizację i produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko własnym postranslacyjnie modyfikowanym białkom; 3) ostre zapalenie błony maziowej, które następnie przechodzi w zapalenie przewlekłe, niszczące chrząstkę stawową i kość okołostawową. Postęp w zrozumieniu patomechanizmów choroby, choć niewystarczający, pozwolił lepiej poznać zjawiska związane z procesem zapalnym, co z kolei umożliwiło opracowanie skuteczniejszych form terapii RZS. Należy jednak podkreślić, że stosowane terapie mają charakter leczenia objawowego, a nie przyczynowego, dlatego konieczne są dalsze badania pozwalające lepiej zrozumieć mechanizmy immunologiczne związane z rozwojem choroby oraz procesy immunologiczne zachodzące podczas terapii. W związku z powyższym wysoce interesująca i aktualna jest tematyka badań podjętych przez Panią mgr. Ewelinę Wędrowską.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ typowy dla dysertacji na stopień naukowy doktora. Na 155 stronach maszynopisu Doktorantka zawarła 12 rozdziałów, wspartych 16 rycinami, 20 tabelami i wykazem aż 599 pozycji piśmiennictwa. Na końcu pracy Doktorantka zawarła spis tabel i rycin, wykaz skrótów oraz załączyła kopię zgód komisji bioetycznej. Praca przygotowana jest bardzo starannie. Napisana jest poprawnie językowo i zrozumiale.

Wstępna część rozprawy to 41 stronicowy opis, w którym szczegółowo przedstawione są najbardziej istotne zagadnienia związane z tematem badawczym. Ta część rozprawy składa się z trzech głównych podrozdziałów, z których dwa pierwsze zostały podzielone na liczne sekcje i podsekcje.

W pierwszym podrozdziale Doktorantka szczegółowo opisuje epidemiologię RZS, przyczyny rozwoju RZS (z podziałem na czynniki środowiskowe, genetyczne oraz czynniki epigenetyczne), symptomy choroby, diagnostykę RZS, oraz dostępne terapie. Podczas opisu czynników epigenetycznych Doktorantka skupiła się na roli miRNA oraz metylacji DNA pomijając mechanizmy związane z modyfikacją białek histonowych, stanowiących istotny choć niezwykle słabo poznany mechanizm epigenetycznej kontroli ekspresji genów w rozwoju RZS. Niniejszym proszę o odniesienie się do tej uwagi. Ciężko zgodzić się również ze stwierdzeniem, że stosowanie leczenia biologicznego niesie ze sobą liczne działania niepożądane. Wdrożenie leczenia biologicznego uznaje się powszechnie za przełomowe w leczeniu RZS, a odpowiednio stosowana terapia uznawana jest za bezpieczną, w której korzyści przewyższają ryzyko występowania działań niepożądanych.

W drugim podrozdziale Doktorantka skupia się na wyjaśnieniu mechanizmów immunologicznych RZS. W tej części opisane zostały populacje komórek układu immunologicznego włączając w to komórki dendrytyczne, limfocyty T, limfocyty B, makrofagi, fibroblasty, neutrofile, a także czynniki rozpuszczalne (cytokiny i mikropęcherzyki) zaangażowane w patomechanizm choroby. Opisując rolę limfocytów pomocniczych typu 1 (Th1) Doktorantka sugeruje, że limfocyty Th1 poprzez produkcję IFN γ aktywują limfocyty B. Powszechnie wiadomo, że odpowiedź typu Th1 (zapalenie T1) związana jest z aktywacją odpowiedzi komórkowej, a nie humoralnej. Tą drugą wspierają natomiast limfocyty Th2. Będę wdzięczny za odniesienie się do tej uwagi. Jednocześnie w tej części wstępu brakuje opisu limfocytów subpopulacji Th2, odgrywających, jak już wspomniano, kluczową rolę w aktywacji limfocytów B. Podczas opisywania roli czynników rozpuszczalnych

w patomechanizmie RZS Doktorantka niezwykle trafnie zauważa, że rola cytokin powinna być rozpatrywana w kontekście całego mikrośrodowiska, a więc balansu pomiędzy każdym elementem je tworzącym. Świadczy to o dużym zrozumieniu skomplikowanych mechanizmów immunologicznych. W tej części omawianego podrozdziału Doktorantka dzieli jednak cytokiny na te o działaniu prozapalnym (opisując TNF, IL-17, IFN- γ , RANKL, IL-26, oraz IL-2) oraz cytokiny o działaniu przeciwzapalnym włączając w to zgodnie z oczekiwaniem IL-10, ale również IL-4, IL-13, IL-5 oraz IL-9. Zaliczenie IL-4, IL-13, IL-5 oraz IL-9 do grona czynników o działaniu przeciwzapalnym jest niezwykle ryzykowne. Pełnią one bowiem kluczową rolę w indukcji zapalenia typu T2 leżącego u podłoża m.in. zapalenia alergicznego oraz astmy Th2 zależnej, a więc wykazują szereg aktywności prozapalnych również w RZS. Oczywiście odpowiedź typu Th2 nie prowadzi do tak znacznego uszkodzenia tkanek jak odpowiedź związana z aktywnością limfocytów Th1, a w przypadku RZS można ją uznać za bardziej preferowaną (co Doktorantka również zauważa na początku tego podrozdziału). Dlatego sugerowałbym, aby charakterystyka czynników rozpuszczalnych biorących udział w patogenezie RZS została opisana bez podziału na czynniki prozapalne, przeciwzapalne oraz wykazujące obie aktywności.

Trzecią część wstępu stanowi uzasadnienie konieczności podjęcia badań. Podrozdział ten w sposób przejrzysty podsumowuje informacje zawarte we wcześniejszych etapach wstępu i wprowadza czytelnika w problematykę podejmowaną w badaniach prowadzonych podczas realizacji projektu doktoranckiego.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem zwrócić uwagę na drobne błędy edycyjne jakie pojawiają się w pierwszym rozdziale rozprawy, takie jak: brak odniesienia w tekście do niektórych tabel, pojawianie się literówek oraz niezachowanie rozróżnienia pomiędzy pisownią genów i białek. Chciałbym jednak podkreślić, że żadne z wyżej wymienionych uwag nie podważają wysokiej wartości merytorycznej omawianego rozdziału, a informacje przedstawione w nim w pełni uzasadniają celowość i znaczenie podjętych przez Autorkę badań.

W rozdziale „Cele pracy” Doktorantka przedstawiła ogólny cel podjętych badań polegający na ocenie zmian znaczników (markerów) aktywacji limfocytów płynu stawowego (powierzchniowych oraz oznaczanych w supernatancie płynu stawowego), pod wpływem leczenia metotreksanem (MTX) i metyloprednizolonem (MPRE) u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Ponadto cel ogólny zostaw wsparty czterema celami szczegółowymi

obejmującymi: 1) Zbadanie subpopulacji limfocytów oraz ekspresji cząsteczek powierzchniowych (CD25, HLA-DR, FasL, TRAIL) i zewnątrzkomórkowych (cytokin oznaczanych w supernatancie płynu: IL-2, IL-4, IL-17, IFN- γ oraz innych białek rozpuszczalnych: sCD25, sFasL oraz sTRAIL) w stawach chorych na RZS przed leczeniem metotreksanem lub metyloprednizolonem; 2) Ocenę w/w znaczników (markerów) w trakcie leczenia tymi lekami i porównanie uzyskanych wyników z wartościami wyjściowymi (przed leczeniem); 3) Ocenę zależności między zmianami markerów aktywacji limfocytów, a stężeniem białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy chorych; oraz 4) Ocenę czy zmiana któregoś z badanych znaczników odpowiada poprawie klinicznej.

Rozdział „Materiały i Metody” rozpoczyna się od opisu materiału wykorzystanego do badań. Materiał do badań stanowiła krew żylna oraz płyn stawowy, który pobierany był od pacjentów z rozpoznaniem RZS. Do badania włączono pacjentów Kliniki Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki łącznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 w Bydgoszczy oraz pacjentów Klinicznego Oddziału Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy. Łączna liczba pacjentów chorych na RZS w badaniu wyniosła 43 osoby, które podzielono zgodnie z przyjętą strategią terapeutyczną, a więc leczonych metotreksanem (n=25) lub leczonych metyloprednizolonem (n=18). Przedstawione grupy wydają się odpowiednio dobrane i zrównoważone pod względem wieku, płci oraz długości trwania choroby. Autorka scharakteryzowała szczegółowo grupę badaną i podała kryteria włączenia i wyłączenia z badania. Na przeprowadzenie projektu uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (kopia zgody została załączona do ocenianej rozprawy).

W dalszej części rozdziału Doktorantka opisała wykorzystywane podczas prowadzenia badań metody, rozpoczynając od szczegółowego opisu sposobu oceny aktywności RZS. W kolejnym fragmencie skupiła się na metodach badań prowadzonych na krwi żyłnej. Opisała sposób pobierania krwi żyłnej oraz metodę oznaczania białka C-reaktywnego w surowicy krwi. Następnie Autorka opisała metody pobierania płynu stawowego oraz metody stosowane do jego analizy obejmujące: ocenę liczebności oraz żywotności komórek izolowanych z płynu stawowego, wykonania preparatów mikroskopowych, barwienia histochemicznego (May Grunwald-Giemsa oraz Hematoksylina Eozyna), a także testów immunoenzymatycznych ELISA, cytometrii przepływowej (w zakresie przygotowania próbek oraz analizy danych cytometrycznych). Część metodyczna zwieńczona jest opisem wykorzystanych testów

statystycznych. Należy podkreślić staranność opisu wykorzystanych przez Doktorantkę metod analitycznych, co świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym. Niemniej dziwić może fakt, że pomimo wykorzystania dość zaawansowanego cytometru przepływowego (FACSCanto II) pozwalającego w najniższej konfiguracji na wykorzystanie sześciu, a w najwyższej dziesięciu kanałów fluorescencji, w trakcie realizacji badania zdecydowano się na jedynie trój kolorowe panele i multiplikowanie próbek. Nie jest to oczywiście błędem, ale w sposób znaczący ogranicza możliwości analityczne. Przedstawiona w tej części strategia bramkowania jest klarowna. Sugerował bym jednak podczas przygotowywania manuskryptu zaprezentowanie całej strategii bramkowania na jednej rycinie i uzupełnienie jej o odpowiednie barwienia kontrolne. Pomoże to w lepszy sposób zobrazować jak ustalane były regiony analityczne (bramki). Ponadto dobrą praktyką jest pozostawianie wartości na osiach cytogramów (nie jest to jednak wymagane we wszystkich czasopismach naukowych). Proszę również o informację czy w trakcie analizy cytometrycznej wykorzystywała była dyskryminacja komórek martwych oraz dubletów?

Opis metodyczny wieńczy podrozdział zawierający krytykę wykorzystanego modelu badawczego. Podrozdział ten składa się z ośmiu punktów, w których Autorka w niezwykle krytyczny sposób przedstawia słabe strony realizowanej pracy wraz z uzasadnieniem. Podejście takie jest niezwykle rzadkie, świadczy o wysokiej świadomości oraz dojrzałości naukowej Doktorantki i zasługuje na szczególne uznanie.

Rozdział „Wyniki” składa się z 7 podrozdziałów w których Doktorantka charakteryzuje chorych z RZS oraz przedstawia wyniki przeprowadzonych analiz laboratoryjnych. Przed opisem wyników Autorka wprowadza czytelnika w sposób prezentacji wyników. Wszystkie wyniki zostały zaprezentowane w tabelach, a najbardziej istotne według Doktorantki zostały dodatkowo zobrazowane graficznie na wykresach. Rozdział jest niezwykle przejrzysty i pozwala z łatwością śledzić rezultaty przeprowadzonych analiz. Podrozdział przedstawiający charakterystykę zgromadzonej grupy chorych na RZS nie zawiera szczegółowego opisu, a jedynie tabelę podsumowującą grupy chorych. Ma to z całą pewnością związek z obszernym opisem pacjentów włączonych do badania w rozdziale Materiały i Metody. Dlatego sugerowałbym dołączenie tabeli 10 jako element opisu przedstawionego we wcześniejszym rozdziale. W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisuje wyniki analiz badania cytologicznego płynu stawowego. W dalszej części tego podrozdziału mgr Wędrowska charakteryzuje odsetki makrofagów/monocytów, limfocytów

oraz granulocytów. W trzeciej części Doktorantka przedstawia wyniki cytometrycznej oceny populacji limfocytów oraz komórek NK. Uzyskane wyniki wartości indeksu CD4/CD8 przedstawione są dodatkowo na wykresie typu „przed vs po”, który pozwala zaobserwować rozproszenie zmian indywidualnych pacjentów w grupach. Prezentacja taka jest bardzo pomocna w zrozumieniu wyników. Sugerowałbym jednak wprowadzenie opisów osi OX oraz OY na wykresie co zwiększy jego czytelność. W podrozdziale czwartym Doktorantka opisuje wyniki badań markerów aktywacji limfocytów, mianowicie CD25, HLA-DR, FasL oraz TRAIL w populacji limfocytów oraz subpopulacji komórek pomocniczych (CD4+) i cytotoksycznych (CD8+). W kolejnej części zaprezentowano wyniki badań zewnątrzkomórkowych znaczników aktywacji limfocytów, a mianowicie czynników rozpuszczalnych, oznaczanych w płynie stawowym pozyskanym od pacjentów chorych na RZS. W podrozdziale szóstym opisano uzyskane wyniki stężenia białka C-reaktywnego w surowicy chorych, a następnie w podrozdziale 7 opisano wyniki badań korelacji poziomów CRP z ocenianymi parametrami immunologicznymi wskazującymi na aktywację limfocytów. Doktorantka zaprezentowała jedynie wyniki istotne statystycznie, wskazując na dodatnią korelację pomiędzy CRP, a odsetkiem HLA-DR+ limfocytów oraz ujemną korelację pomiędzy CRP, a odsetkiem limfocytów CD8+TRAIL+ w obu analizowanych grupach przed leczeniem jak i po jego zakończeniu. Ciekawe było by również przeanalizowanie zależności pomiędzy zmianami (powszechnie oznaczanych jako „delta”) w stężeniu CRP oraz analizowanych markerów aktywacji limfocytów w obu analizowanych grupach.

Wyniki zostały omówione wyczerpująco w szerokiej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Pani mgr Eweliny Wędrowskiej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników. Dyskusję podzielono na podrozdziały, które w odróżnieniu od pozostałych rozdziałów dysertacji nie znalazły swojego odniesienia w spisie treści.

Podsumowanie pracy stanowi 11 wniosków, odpowiadających na założony cel badań. Wnioski są trafnie sformułowane i poparte uzyskanymi wynikami przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

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 Panią mgr Ewelinę Wędrowską 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 Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Wędrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na oryginalność przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres oraz staranność przygotowania przedstawionej do oceny pracy, składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Białystok, 11.07.2022



dr hab. Andrzej Eljaszewicz