



INSTYTUT PSYCHIATRII I NEUROLOGII

II KLINIKA NEUROLOGICZNA



Kierownik: Prof. dr hab.n.med. Iwona Kurkowska-Jastrzębska

adres: ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa; tel. +48-22-4582537; fax:+48-22-8429322; e-mail: neuro2@ipin.edu.pl

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne lekarz Julii Rudnickiej-Czerwiec.

Tytuł rozprawy: Analiza populacji komórek NK u pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego.

Promotor prof. dr hab. n med. Halina Bartosik-Psujek
Promotor pomocniczy dr n. biol. Edyta Kopera

Strona formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest manuskryptem przedstawionym w formie publikacji wydanej w Rzeszowie w 2024r . Praca powstała w Zakładzie Neurologii Instytutu Nauk Medycznych Kolegium Naum Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Praca doktorska liczy 175 stron, ma typowy układ rozprawy ze wstępem obejmującym podstawy naukowe, następnie cele pracy i pytania badawcze, opis metodyki, opis wyników, dyskusje podzieloną na podrozdziały oraz podsumowanie i wnioski oraz spis piśmiennictwa. Manuskrypt zawiera 18 tabel, 39 rycin oraz na końcu w postaci załącznika zgodę komisji bioetycznej na przeprowadzenie badania.

Problem badawczy

Doktorantka podejmuje w pracy oceny komórek limfocytarnych NK (*Natural Killer*) u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.

Problem podjęty w pracy doktorskiej uważam za ważny i warty podjęcia. Patogeneza stwardnienia rozsianego nie jest do końca poznana, a rola komórek układu immunologicznego odporności wrodzonej jest obecnie coraz szerzej badana w kontekście inicjacji i rozwoju choroby. Pomimo istnienia wielu leków immunomodulujących i immunosupresyjnych nie uzyskuje się obecnie pełnego wyleczenia. Leki stosowane w SM nakierowane są na hamowanie działania limfocytów – niewybiórcze działające na prawie wszystkie subpopulacje limfocytów lub wybiórcze nakierowane na specyficzne populacje limfocytów T i B. Dzięki wprowadzeniu leczenia liczba rzutów i stopień uszkodzenia układu nerwowego zmniejszył się, jak również wydłużył się czas do pojawienia się niezależnej od rzutów

progresji niepełnosprawności, nie mamy jednak sukcesu w postaci pełnego wyleczenia SM. Obecnie zwraca się uwagę na komórki odporności wrodzonej, takie jak inne rodzaje limfocytów, makrofagi i mikroglej, które biorą udział w rozwoju reakcji zapalnej w SM. Być może ich rola jest kluczowa na pewnych etapach choroby, dlatego poza poznaniem ich udziału w rozwoju SM mogłyby być celem nowych interwencji terapeutycznych.

Szczególne zainteresowanie budzą komórki NK, które jak opisała Doktorantka wykazują znaczną ekspansję w odpowiedzi na terapie modyfikujące przebieg choroby (DMT) [np. daklizumab, fingolimod, kladrybina). Komórki NK są klasyfikowane jako wrodzone komórki limfoidalne grupy 1 (ILC1) i posiadają zdolność do szybkiego identyfikowania i niszczenia komórek zmienionych takich jak komórki nowotworowe i komórki zakażone wirusem. Aktywacja komórek NK zależy od dysregulacji sygnalizacji przekazywanej przez receptory aktywujące i hamujące, a także obecności cytokin związanych ze stanem zapalnym. W kontekście chorób autoimmunologicznych komórki NK, głównie podzbiór CD56^{bright}, mogą eliminować autoreaktywne komórki T np. poprzez wydzielanie białek bezpośrednio niszczących komórki takich jak granzymy i perforyna. Natomiast w badaniach nad SM eliminacja autologicznych autoreaktywnych komórek CD4⁺ przez komórki NK CD56^{bright} jest upośledzona jak pokazały badania [np. Laroni et al. J. Autoimmun. 2016;72:8–18]. Wykazano również, że komórki NK CD56^{dim} mają zdolność zabijania aktywowanych komórek T. Badacze próbują wiązać poszczególne subpopulacje komórek NK z rzutem, ryzykiem aktywacji zapalenia, odpowiedzią na leczenie, ich rola nie jest jednoznaczna i prawdopodobnie wiąże się z wieloma czynnikami dodatkowymi jak również z fazą choroby.

Podsumowując temat podjętej pracy doktorskiej jest oryginalny i interesujący. Dodatkowo jest niewiele prac badających populacje komórki NK na różnych etapach rozwoju SM.

Ocena poszczególnych części pracy

Wstęp obejmuje 28 stron i zawiera omówienie stwardnienia rozsianego (epidemiologii, czynników ryzyka, objawów choroby i metod leczenia) oraz bardzo dokładne omówienie aktualnej wiedzy na temat immunopatogenezy SM w tym roli komórek NK w regulacji odpowiedzi immunologicznej i możliwego ich udziału w rozwoju SM. Moim zdaniem wstęp zawiera dobre i jasne omówienie aktualnego stanu wiedzy, obejmujące najważniejsze tematy i stanowi wytłumaczenie podjęcia się przedstawionego problemu badawczego.

Cele pracy są jasno, ale bardzo enigmatycznie sformułowane. Główny cel jest bardzo ogólny, ale pytania badawcze wskazują, że celem pracy jest analiza populacji komórek NK w trzech grupach osób – dwóch grupach chorych na SM – nie leczonych chorych z postacią rzutową choroby, nieleczonych chorych z postacią pierwotnie postępującą oraz w dobranej wiekowo i według płci grupie kontrolnej.

Drugim celem szczegółowym jest analiza zdolności komórek NK do produkcji cytokin i substancji cytotoksycznych w wyniku czego komórki zostały poddane stymulacji w krótkiej hodowli. Trzeci cel ma stanowić podsumowanie i analizę uzyskanych danych i ocenić czy funkcja komórek NK w trzech badanych grupach może się różnić.

Materiał i metody stosowane w pracy są prawidłowo i bardzo szczegółowo opisane oraz zilustrowane rycinami pokazującymi etapy poszczególnych metod oznaczania komórek. Brakuje jednak przedstawienia całościowego planu badania opisującego jak zamierza się rozwiązać zadane pytania badawcze (co ma się zaimplementować i dlaczego). Ten aspekt mógł być zawarty w nieco bardziej rozbudowanych pytaniach badawczych lub teraz w planie badania. Plan badania powinien moim zdaniem zawierać stwierdzenie, że pacjenci mieli jednokrotnie pobraną krew, z której wykonywano izolacje leukocytów i zamrożono je, a potem hodowano po rozmrożeniu w warunkach jednorodnych dla wszystkich grup. Metodyka powinna odnieść się również do różnicy w oznaczaniu markerów z krwi świeżej i z komórek stymulowanych – dlaczego wybrano taką metodę pracy i czy jest ona uzasadniona. Jak się domyślam, badano reaktywność komórek nie zaś ich fenotypowy obraz u pacjentów. Dodatkowo nie jest jasno wyjaśnione dlaczego wybrano takie, a nie inne markery komórkowe powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe – czy i jak na ich podstawie można wydzielić populacje komórek NK o różnych funkcjach.

Brakuje mi również opisanego sposobu rekrutacji pacjentów. Ponieważ były to osoby nieleczone należałoby zaznaczyć, czy pacjenci zostali zrekrutowani spośród osób będących pod opieką poradni (przewlekłe) i dlaczego nie podjęli leczenia (kryteria kwalifikacji zakładają, że pacjenci nigdy nie byli leczeni przewlekłe immunosupresyjnie) lub zaznaczyć czy były to osoby z nowo rozpoznanym SM zgłaszające się do leczenia do poradni (czy były to kolejne zgłaszające się osoby, w jakim przedziale czasu nastąpiła rekrutacja itp). Ilu pacjentów zrekrutowano i w jaki sposób, czy zrezygnowano na etapie rekrutacji z uczestników (Doktorantka opisuje tylko brak oznaczeń krwi z powodów technicznych) – opis taki wyklucza możliwość błędu wynikającego z metody doboru grupy lub pozwala na uwzględnienie go (o ile istnieje) w analizie.

Wyniki: Doktorantka zebrała grupę 35 chorych z klinicznie pewnym rozpoznaniem stwardnienia rozsianego (22 osoby z RRMS i 13 osób z PPMS) oraz 15 osobową grupę kontrolną. Kryteria kwalifikacji są jasne i pozwalają na wykluczenie podstawowych czynników mogących wpłynąć na wyniki badania. Ze względu na rodzaj wykonywanych oznaczeń i prawdopodobnie trudność w znalezieniu uczestników badania jest ona mała szczególnie jeśli podzieli się ją ze względu na rozpoznanie i ma nadreprezentację kobiet. Nie dyskwalifikuje to w żaden sposób możliwości analizy wybranych parametrów, ale zmniejsza możliwość pogłębionej analizy (podział ze względu na inne czynniki charakteryzujące chorych choćby

wiek, płeć, czas choroby). W opisie grupy chorych brakuje czasu od początku choroby lub czasu od ostatniego rzutu lub liczbę rzutów w ciągu 3-6 miesięcy, bo są to czynniki mogące wpływać na liczbę i rodzaj komórek NK (choć kryteria kwalifikujące częściowo ograniczają wymagany czas od ostatniego rzutu - wynoszący co najmniej 8 tygodni).

Wyniki badań markerów i populacji komórek NK są przedstawione w szeregu tabel, a wyniki różniące się statystycznie dodatkowo zilustrowano rycinami. Należy zwrócić uwagę na bardzo staranny graficznie wygląd pracy – autorka we wstępie, metodyce i wynikach wykonała szereg eleganckich rycin ułatwiających czytanie i pozwalających na lepsze zrozumienie skomplikowanego tematu.

Dyskusja podzielona jest na podrozdziały obejmujące kolejne oznaczane biomarkery. Należy podkreślić że dyskusja jest bardzo staranna, ciekawa i obejmuje przegląd najnowszego piśmiennictwa. Autorka wykazuje się dużą znajomością przedstawianego tematu i potrafi w przejrzysty sposób go przedstawić, odnosząc się zarówno do wyników zgodnych z przedstawionymi w pracy jak i odmiennymi. Nie mam znaczących uwag co do przedstawionej dyskusji wyników. Podsumowanie również jest przedstawione w tabelach zbierających wszystkie zaobserwowane różnice. Brakuje mi jednak, aby podsumować wyniki spoglądając całościowo na pacjentów z RRMS i PPMS vs kontrola.

Na przykład u pacjentów z SM populacje NK CD56^{bright} i CD56^{dim} są równoliczne, ale w RRMS mniej komórek CD56^{bright} zawiera granzym K, INFgamma i IL10, a w PPMS może liczba komórek jest podobna ale za to ma mniejszą ekspresję INFgamma. Może to świadczyć że komórki NK CD56^{bright} mają zaburzone funkcje hamujące rozwój reakcji immunologicznej zarówno w postaci RRMS i PPMS. Moim zdaniem w końcowej części dyskusji Doktorantka powinna zaproponować właśnie spojrzenie jakby z drugiej strony. Doktorantka bardzo ostrożnie odnosi się do różnic pomiędzy pacjentami z SM a kontrolą nie chcąc tworzyć rozbudowanych teorii na podstawie małej grupy pacjentów. Jest to zrozumiałe, ale sformułowane wnioski są według mnie zbyt powielające podsumowanie wyników nie zaś stwierdzeniami co z nich wynika.

Podsumowując, całość pracy Doktorantki, pomimo zamieszczonych uwag, oceniam bardzo dobrze. Zarówno temat podjętej pracy jak również wykonanie i prezentacja wyników są interesujące i przedstawione w sposób bardzo dobry. Mimo pytań, które nasuwają się po czytaniu dyskusji i uwag dotyczących metodyki pracy przedstawiona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracy doktorskiej.

Konkluzja recenzji

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Julii Rudnickiej -Czerwiec pt: „ Analiza populacji komórek NK u pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postaci stwardnienia rozsianego. ”, jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego oraz wykazuje świetną wiedzę doktorantki w uprawianej dyscyplinie naukowej (nauki medyczne) oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Rozprawa doktorska jest samodzielnym dorobkiem naukowym Doktorantki i 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.).

Wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie lekarz Julii Rudnickiej -Czerwiec do publicznej obrony.

Wnoszę również o wyróżnienie rozprawy ze względu na trudność i nowość podjętego tematu będącego na granicy immunologii i oraz na dobre przedstawienie otrzymanych danych.



Iwona Kurkowska-Jastrzębska

Warszawa 20.08.2024

