

dr hab. n. med. Ewa Kontny,
prof. nadzw.
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji (NIGRiR)
w Warszawie
Zakład Patofizjologii i
Immunologii

Warszawa, 25.10.2017

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wawrzyckiej-Adamczyk pt.:
„Rola markerów odpowiedzi immunologicznej Th17 i Treg w ocenie aktywności
ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA)”.

Praca doktorska została wykonana w II Katedrze Chorób Wewnętrznych im. Prof. A. Szczeklika Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem **prof. dr hab. med. Jacka Musiała**.

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA – *granulomatosis with polyangiitis*) to choroba występująca rzadko (ok. 2,5-10 przypadków na milion), ale o ciężkim przebiegu klinicznym, charakteryzująca się martwicznym zapaleniem naczyń krwionośnych małego i średniego kalibru w różnych narządach, głównie w układzie oddechowym i nerkach. Chociaż najczęściej zapadają na nią osoby w piątej dekadzie życia, to dotyczy ona także dzieci. Chorzy wymagają intensywnego leczenia immunosupresyjnego. Przed wprowadzeniem do terapii glikokortykosteroidów i cyklofosfamidu, śmiertelność chorych na GPA była bardzo wysoka, bliska 90%. Wczesna diagnostyka i odpowiednie leczenie immunosupresyjne sprawiły, że obecnie choroba przebiega z okresami zaostrzeń i remisji. Remisję kliniczną osiąga niemal 90% chorych, jednak u co najmniej 50% są nawroty choroby. Z tego powodu trwają intensywne poszukiwania użytecznych w praktyce klinicznej biomarkerów aktywności

choroby, wskaźników predykcyjnych i prognostycznych, które mogłyby ułatwić dobór odpowiedniej terapii i zapobiegać nawrotom choroby.

Ziarniniakowość z zapaleniem naczyń należy do grupy pierwotnych zapaleń naczyń powiązanych z obecnością przeciwciał przeciwko cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA – *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*). Uważa się, że ANCA bezpośrednio uszkadzają śródbłonek naczyń oraz aktywują krążące, uczulone neutrofile. Tym z kolei komórkom przypisuje się kluczową rolę w patogenezie choroby, m.in. poprzez tworzenie zewnątrzkomórkowej sieci NET, uwalnianie mikrocząstek, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i degranulację enzymów uszkadzających śródbłonek naczyń. Podkreśla się także udział alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza w tych procesach. Pomimo dowodów wskazujących na patogenną rolę ANCA, przydatność oznaczania miana tych przeciwciał do prognozowania klinicznego przebiegu choroby i podejmowania odpowiednich decyzji terapeutycznych jest wciąż dyskutowana, wydaje się być ograniczona do określonego podtypu choroby i wymaga dalszego potwierdzenia. Użyteczność proponowanych biomarkerów odzwierciedlających aktywację komórek układu odporności wrodzonej (neutrofilów, makrofagów) jest jeszcze słabiej udokumentowana. W ziarniniakowości z zapaleniem naczyń, podobnie jak w innych chorobach o podłożu autoagresyjnym, obecność patogennych autoprzeciwciał a także opisywane zaburzenia ilościowe i czynnościowe limfocytów T wskazują na ważną rolę układu odporności nabytej w rozwoju choroby. Nie ma jednak jasności, czy nieprawidłowości dotyczące limfocytów T są powiązane z obrazem klinicznym choroby i/lub mają znaczenie prognostyczne.

Doktorantka podjęła to zagadnienie stawiając sobie za cel zbadanie, czy zmiany w obrazie odsetkowym subpopulacji limfocytów T są markerem aktywności ziarniniakowości z zapaleniem naczyń. Aby zrealizować zamierzenie pracy doktorantka sformułowała cele szczegółowe, które określają zakres przeprowadzonych badań i obejmują

ocenę ilościową: (i) podstawowych subpopulacji limfocytów T – pomocniczych (CD4+) i cytotoksycznych (CD8+); (ii) podtypów pomocniczych limfocytów T (Th1, Th2, Th17, Th22), identyfikowanych na podstawie wytwarzanych cytokin oraz odpowiedników wykonawczych tych komórek, wyróżnianych w oparciu o ekspresję receptorów chemokinowych, a także (iii) regulatorowych limfocytów T (Treg), w tym komórek z niedoborem funkcji supresorowej (Δ E2-FoxP3+). Zaletą pracy jest to, iż powyższe oznaczenia doktorantka przeprowadziła w odpowiednio dobranych grupach chorych: (i) w fazie zaostrzenia i stabilnej remisji oraz (ii) z zaostrzeniem choroby przed i po sześciomiesięcznej terapii immunosupresyjnej i osiągnięciu wczesnej remisji klinicznej. Układem odniesienia była grupa zdrowych dawców.

Przedstawiona do oceny praca liczy 100 stron tekstu, ma typowy układ. Rozpoczyna się spisem treści i wykazem stosowanych skrótów (wyjaśnienie niektórych skrótów, np. CTLA4, GITR, NF κ B, PTPN22, jest nieprecyzyjne), zawiera 5 rozdziałów („Wstęp”, „Założenia i cele pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”), po których zamieszczone są „Wnioski”, „Streszczenie” w jęz. polskim i jęz. angielskim oraz wykaz piśmiennictwa.

- **Wstęp**, liczący 20 stron, w sposób przejrzysty i wyczerpujący omawia następujące zagadnienia dotyczące ziarniniakowości z zapaleniem naczyń: (i) epidemiologię i obraz kliniczny wraz z opisem wskaźników klinicznych służących ocenie aktywności zapaleń naczyń (skala BVAS), utrwalonych uszkodzeń narządowych (wskaźnik VDI), jakości życia (kwestionariusz SF-36), wskaźników prognostycznych (skala FFS); (ii) podstawowe mechanizmy etiopatogenezy (uwarunkowania genetyczne, charakterystykę i znaczenie ANCA, rolę neutrofilów, innych komórek i mediatorów zapalenia); (iii) udział limfocytów T w etiopatogenezie, w tym rolę komórek Th17 i Treg, z rozszerzeniem na inne choroby autoimmunizacyjne. Jest to bardzo dobre

wprowadzenie uzasadniające cel i zakres badań przeprowadzonych przez doktorantkę, choć część cytowanych prac dotyczących limfocytów T mogłaby być przeniesiona do dyskusji.

- **Założenia i cele badawcze** są sformułowane logicznie i precyzyjnie.
- **Metody badawcze** nie budzą zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobry dobór grupy badanej i ocena kliniczna chorych na GPA. W oznaczeniach laboratoryjnych autorka rozprawy stosowała ocenę cytometryczną, zarówno do określenia fenotypu komórek, wytwarzanych przez nie cytokin, jak i oszacowania ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Zaletą pracy jest zastosowanie komplementarnych metod do identyfikacji subpopulacji limfocytów T, w tym Treg. Cennym uzupełnieniem jest przedstawiony graficznie schemat badania oraz wykresy z cytometru ilustrujące metodę analizy subpopulacji limfocytów. W analizie wyników zastosowano właściwe testy statystyczne.
- **Wyniki** są opisane przejrzysto, w logicznym porządku, zgodnie z zaplanowanymi celami szczegółowymi. Przedstawiono je graficznie w formie 2 tabel i 13 rycin (na ryc 16 jest błąd – panel środkowy i prawy są identyczne). Najważniejszymi osiągnięciami badań są następujące obserwacje: (i) charakterystyczną cechą chorych na GPA jest zwiększona liczba limfocytów Treg posiadających izoformę czynnika transkrypcyjnego FoxP3 bez egzonu 2 ($\Delta E2$ -FoxP3+), jak również zwiększona liczba komórek wytwarzających IL-17 i IL-22, w tym pomocniczych limfocytów Th17 i Th22 i ich odpowiedników czynnościowych („Th17-like”, „Th22-like”); liczba tych komórek jest niezależna od aktywności klinicznej choroby, ani nie koreluje z analizowanymi wskaźnikami procesu chorobowego; (ii) w fazie stabilnej remisji klinicznej dochodzi do limfopenii, dotyczącej przede wszystkim pomocniczych limfocytów T, a także wzrostu odsetka limfocytów Th2 (i komórek wytwarzających

IL-4) oraz odsetka Treg; (iii) odsetek limfocytów Treg koreluje ujemnie ze wskaźnikiem aktywności klinicznej choroby (BVAS) i wskaźnikiem uogólnionej odpowiedzi zapalnej (CRP); (iv) w fazie wczesnej remisji nie dochodzi do normalizacji powyższych zaburzeń, a ich charakter jest podobny jak w fazie zaostrzenia. Autorka konkluduje, że ustępowanie zmian w obrazie odsetkowym limfocytów, charakterystycznych dla zaostrzenia GPA, trwa dłużej niż 6 miesięcy, nawet jeśli nie stwierdza się już klinicznych cech aktywności zapalenia naczyń. Proponuje również, że odsetek limfocytów Treg może znaleźć zastosowanie jako marker aktywności GPA.

- **Dyskusja** jest napisana w sposób wyważony, podkreśla najciekawsze osiągnięcia pracy nawiązując do badań innych autorów, wskazuje także nowe możliwości i kierunki badawcze. W mojej opinii warto byłoby ją wzbogacić o fragment dotyczący limfocytów Th22 i IL-22, a także pogłębienie dyskusji na temat limfocytów Treg ($\Delta E2$ -FoxP3+). Pewnym mankamentem jest brak odsyłaczy do wyników pracy (rycin) oraz stosunkowo mała liczba cytowanych prac w porównaniu ze „Wstępem”.
- **Streszczenia** (w jęz. polskim i angielskim) napisane w sposób zwięzły i klarowny oddają istotę pracy, choć zamieszczenie wniosku o zmianach ilościowych limfocytów T dziewiczych i wykonawczych jest niespójne i nie ma uzasadnienia w „Wynikach”.
- **Piśmiennictwo** – dobrane właściwie ale są pewne pomyłki w cytowaniu i numeracji: (i) praca nr 112 nie jest cytowana, zamiast niej przytoczono pracę nr 111 (str. 22); (ii) od 152 pozycji piśmiennictwa jest rozbieżność w numeracji cytowanych prac pomiędzy tekstem a wykazem piśmiennictwa (przesunięcie o 1 pozycję); (iii) brak tytułu pracy nr 195; (iv) zdarzają się drobne błędy literowe.

Przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr Katarzyny Wawrzyckiej-Adamczyk spełnia wszelkie wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi (*art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późn. zm.; Dz.U. 2016, poz. 882*), a drobne niedociągnięcia redakcyjne nie umniejszają jej wartości merytorycznej. **W związku z powyższą pozytywną oceną, zwracam się do Wysokiej Rady Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Katarzyny Wawrzyckiej-Adamczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie składam wniosek o wyróżnienie omówionej pracy.**

Warszawa, 25.10.2017



dr hab. n. med. Ewa Kontny,

prof. nadzw. NIGRiR