

Lublin, 09.09.2024

Dr hab. n. med. Anna Jamroz-Wiśniewska, prof. UM
Katedra i Klinika Neurologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Julii Rudnickiej-Czerwiec pt. „Analiza populacji komórek NK u pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego”

Stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis, MS) jest autoimmunologiczną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) najczęściej dotykającą młodych dorosłych, której patogenezą nie została dotychczas dokładnie wyjaśniona. Zachodząca w MS reakcja autoimmunologiczna wynika z zachwiania równowagi pomiędzy aktywnością zapalną – efektorową i regulatorową. Biorą w niej udział limfocyty TCD4+, limfocyty TCD8+, limfocyty B i elementy odpowiedzi nieswoistej. Do istotnych elementów odpowiedzi nieswoistej biorącej udział w patogenezie MS należą komórki NK (natural killer). Doniesienia dotyczące roli tych komórek w MS są niejednoznaczne: ich działania mają zarówno charakter regulatorowy jak i patogenny, ponieważ pełnią w organizmie różne funkcje. Dlatego wydaje się w pełni uzasadnione, że Doktorantka podjęła temat oceny znaczenia komórek NK w patogenezie MS.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ, z podziałem na kolejne rozdziały, jak wstęp, cel pracy i pytania badawcze, pacjenci, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie wyników i wnioski. Wstęp poprzedza wykaz skrótów używanych w tekście. Na końcu rozprawy zamieszczono streszczenie w języku

WPEŁYŃŁO DNIA
17.09.2024
podpis

polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel, spis rycin oraz załączniki w postaci skanu uchwał Komisji Bioetycznej z podpisami jej członków.

We Wstępie Doktorantka scharakteryzowała epidemiologię choroby, która była przedmiotem Jej badań, opisała czynniki ryzyka i patogenezę MS, podała podział na fenotypy MS, t.j.: klinicznie izolowany zespół (clinically isolated syndrome, CIS), postać rzutowo-remisyjna (relapsing-remitting MS, RRMS), wtórnie postępująca (secondary progressive MS, SPMS) i pierwotnie postępująca (primary progressive MS, PPMS) oraz kryteria ich rozpoznania. Następnie scharakteryzowała mechanizmy odporności wrodzonej, opisując rolę poszczególnych komórek efektorowych odporności wrodzonej w patogenezie MS, podając dostępne w literaturze naukowej informacje na temat roli komórek NK w OUN i patogenezie MS. Podkreśliła, że doniesienia dotyczące komórek NK i ich roli w patogenezie MS są niejednoznaczne, ponieważ mogą one pełnić różne funkcje - od cytotoksycznych po regulatorowe, w związku z czym potrzebne są dalsze badania celem określenia roli tych komórek w patogenezie MS.

Następnie Doktorantka przedstawiła cel pracy i pytania badawcze. Celem pracy była ocena znaczenia komórek NK w patogenezie MS. Pytania badawcze dotyczą zagadnienia ewentualnych różnic w fenotypie komórek NK, wydzielaniu enzymów litycznych i cytokin przez komórki NK oraz funkcji komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS a grupą kontrolną.

W rozdziale Pacjenci, Materiał i metody, Doktorantka opisała grupę badaną i kryteria włączenia do badania, a także grupę kontrolną z warunkami kwalifikacji do badania. Do badania włączono 35 pacjentów z MS - 22 pacjentów z RRMS i 13 pacjentów z PPMS; grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. W ocenie analitycznej wykorzystano próbki krwi żyłnej pobranej w grupie chorych z RRMS i PPMS oraz grupie osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną.

Następnie Doktorantka opisała metodologię Analizy materiału: izolację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, zakładanie hodowli komórkowych, oznaczanie markerów powierzchniowych komórek, markerów wewnątrzkomórkowych, analizę cytometryczną. Metodykę zobrazowała na czytelnych rycinach. W zakończeniu rozdziału opisała analizę statystyczną wyników. Dobór i procedury zastosowanych

metod badawczych oceniam jako prawidłowe i nowoczesne. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Izbie Lekarskiej w Rzeszowie.

W rozdziale Wyniki, na 50 stronach Autorka zaprezentowała charakterystykę grupy badanej i kontrolnej z omówieniem wyników badań, które przedstawiła w postaci tabel i rycin, co ułatwiło ich czytelność.

W kolejnym rozdziale „Dyskusja”, z dużym znawstwem problematyki badawczej, uzyskane wyniki własne zamieszczone w opublikowanych materiałach porównywała i dyskutowała z wynikami opisywanymi przez innych badaczy.

Na uwagę zasługują wyniki analizy populacji komórek NK u pacjentów z MS w konfrontacji z grupą kontrolną.

Komórki NK pacjentów z MS różnią się od komórek NK osób zdrowych

- odsetkiem komórek zawierających granzym B i K, ale nie odsetkiem komórek zawierających perforynę

- zawartością transformującego czynnika wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta, TGF- β), interferonu gamma (ang. interferon gamma, IFN- γ), interleukiny (IL) IL-10, IL-4, ale nie IL-13.

Komórki NK pacjentów z MS poprzez mniejszą zawartość cytokin przeciwzapalnych, mogą wykazywać osłabioną funkcję regulatorową w porównaniu do komórek NK zdrowych osób.

Komórki NK pacjentów z badanymi fenotypami MS nie różnią się od siebie i od komórek NK osób zdrowych

- odsetkiem danego fenotypu (różnice fenotypowe stwierdzono jedynie na podstawie analizy mediany intensywności fluorescencji (MFI – median fluorescence intensity)

Komórki NK pacjentów z badanymi fenotypami MS różnią się od siebie

- zawartością cytokin jedynie w zakresie MFI.

Odsetek komórek NK pacjentów z badanymi fenotypami MS nie różni się od siebie pod względem zawartości enzymów cytotoxicywnych.

Rozprawa wzbogacona jest 18 tabelami i 40 rycinami, w których zamieszczone dane pozwalają na lepsze zrozumienie tekstu dysertacji i czytelne zaprezentowanie wyników badań.

Podczas przygotowywania rozprawy do druku Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych usterek, przede wszystkim literowych/redakcyjnych:

- sformułowanie drugiego wniosku „Komórki NK pacjentów z MS różnią się od komórek NK osób zdrowych zawartością granzymu B i K, ale nie perforyny.” lepiej brzmiałoby: „Odsetek komórek NK zawierających granzym B i K pacjentów z MS różni się od odsetka komórek NK osób zdrowych, ale nie wykazano różnicy pod względem odsetka komórek zawierających perforynę.”,
- brak wyjaśnienia w tekście niektórych używanych skrótów (np. CD58, TYK2, STAT3 - str. 12, FOXP3+, Tr1 - str. 14, EDSS - podano polską nazwę skali, brak nazwy anglojęzycznej - str. 16),
- niektóre nazwy, pomimo podania wcześniej skrótów, są używane ponownie w całości (np. stwardnienie rozsiane, zamiast MS),
- drobne błędy literowe, jak np. brak “w” w zdaniu “Głównymi grupami komórek biorącymi udział reakcji autoimmunologicznej są...”, “licznia” zamiast “liczenia” w opisie ryc. 6.
- ponadto, sformułowanie hipotezy badawczej, podniosłoby poziom naukowy rozprawy.

Wymienione błędy nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Julii Rudnickiej-Czerwiec stanowi oryginalną, wartościową pracę badawczą, na co składają się takie elementy jak interesująca, nowatorska tematyka badawcza, osiągnięcie zamierzonych celów badawczych, prawidłowo przeprowadzone badania zarówno kliniczne, jak i doświadczalne, poprawna metodyka badań, prawidłowo sformułowane wnioski. Należy podkreślić przeprowadzenie szerokiego zakresu oznaczeń analizy cytometrycznej u 50 osób badanych. Omówienie i dyskusja wyników badań wskazują na umiejętność Doktorantki do formułowania i weryfikacji hipotez oraz logicznego wnioskowania. Praca zawarta na 172 stronach, jest dobrze udokumentowana m.in. poprzez cytowanie 274 publikacji (w tym 139 pozycji z ostatnich 10 lat), wyłącznie anglojęzycznych.

Należy podkreślić, że Doktorantka wykonała szereg oznaczeń analizy cytometrycznej, otrzymując wyniki dotyczące wielorakich zmiennych: fenotyp komórek NK w różnych subpopulacjach, odsetek komórek z wewnątrzkomórkową zawartością enzymów cytotoxicytnych (granzymu B, granzymu K) i perforyny oraz wewnątrzkomórkowa zawartość cytokin (TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13). Otrzymała szereg wyników dla trzech grup badanych (RRMS, PPMS, grupa kontrolna), które czytelnie przedstawiła w 12 tabelach i na 30 rycinach, z oznaczeniem w kolorze wyników z istotnością statystyczną. Uzyskane rezultaty badań niewątpliwie przyczynią się do poznania patogenezy MS.

Z uwagi na powyższe, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa pt. **„Analiza populacji komórek NK u pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego”** spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20. lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, stawiane pracy doktorskiej i mam zaszczyt przedstawić **Radzie Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego – wniosek o dopuszczenie lek. Julii Rudnickiej-Czerwiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Przedłożona rozprawa doktorska wnosi nowe wartości poznawcze z zakresu badań immunologicznych w MS dotyczących m.in. różnic w immunofenotypie komórek NK z uwzględnieniem populacji komórek z wewnątrzkomórkową zawartością enzymów cytotoxicytnych i cytokin, dlatego wnoszę o **wyróżnienie dysertacji lek. Julii Rudnickiej-Czerwiec.**

Anna Jamroz-Wisniewska