

**ZAKŁAD DIAGNOSTYKI HEMATOLOGICZNEJ
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W BIAŁYMSTOKU
ul. WASZYNGTONA 15a
15-269 BIAŁYSTOK
tel. / fax 85 831 85 88
e-mail: zdh@umb.edu.pl**



Białystok, 28.12.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej
na stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
mgr MAGDALENY OSTAFIN
pt.: „Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przebiegu ostrych białaczek
u dzieci”**

Dzieci chore na ostre białaczki należą do grupy wysokiego ryzyka powikłań infekcyjnych, a zaburzenia odporności mają złożoną przyczynę. Neutrofile stanowią pierwszą nieswoistą linię obrony organizmu przed infekcjami, zwłaszcza bakteryjnymi i grzybiczymi. W przebieg ostrych białaczek wpisane są zarówno neutropenia, nasilająca się podczas chemioterapii, jak również upośledzenie funkcji neutrofilów.

Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) jest stosunkowo niedawno opisaną funkcją neutrofilów. Pomimo dość dobrego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za uwalnianie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych, a także roli NETs w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej na różnych płaszczyznach, wiedza w na temat ich klinicznego znaczenia jest nadal niewystarczająca, a prowadzone badania dotyczą przede wszystkim chorób infekcyjnych i o podłożu zapalnym, jak również chorób z autoagresji. Publikacje na temat roli zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w ostrych białaczkach są nieliczne i dotyczą osób dorosłych, a tym samym przede wszystkim ostrych białaczek mieloblastycznych. Stąd warto zauważyć, że temat badań podjętych przez mgr Magdalenę Ostafin jest nowatorski i w pełni uzasadniony.

Badania zostały zaprezentowane w formie rozprawy o typowym klasycznym układzie, obejmującej 169 stron starannie opracowanego maszynopisu, 23 ryciny i 28 tabel.

W rozprawie Doktorantka wydzieliła osiem głównych rozdziałów. Właściwy tekst pracy jest poprzedzony „Spisem treści”, „Spisem rycin”, „Spisem tabel” oraz alfabetycznym „Wykazem stosowanych skrótów”, co ułatwia „poruszanie się” w treści pracy i szybkie odnalezienie potrzebnych informacji.

Streszczenia w języku polskim i angielskim stanowią celne podsumowanie najważniejszych informacji na temat uzasadnienia celowości podjętych badań, opisu grupy badanej, stosowanych metod badawczych, uzyskanych wyników i sformułowanych na ich podstawie wniosków.

Zasadniczy tekst pracy rozpoczyna obszerny 38 -stronicowy „Wstęp”, w którym Doktorantka opisuje rolę granulocytów obojętnochłonnych w odpowiedzi immunologicznej organizmu, rozpoczynając od przebiegu i czynników regulujących proces granulopoezy, poprzez opis budowy granulocytów obojętnochłonnych w kontekście dostosowania do pełnionych funkcji, przybliżenie procesu chemotaksji, fagocytozy, mechanizmów zabijania drobnoustrojów przez neutrofile i ostatecznie przechodząc do zagadnienia zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych, co bezpośrednio wiąże się z przeprowadzonymi badaniami. Doktorantka w oparciu o współczesny stan wiedzy przedstawiła budowę zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych oraz mechanizmy ich uwalniania, co zilustrowała rycinami (ryc. 5 str. 39 i ryc. 6 str. 42) pozwalając w czytelny sposób zapoznać się z opisywanymi zagadnieniami. Zwróciła uwagę na czynniki stymulujące tworzenie NETs, a przykładowe stymulatory zostały zestawione w tabeli (tab. 2 str. 40), co daje uzasadnienie do zastosowania podczas eksperymentu różnych czynników stymulujących (PMA, fMLP i CI) oraz przeprowadzenia badań podczas epizodów ciężkich zakażeń. Ważne miejsce we wstępnej części pracy zajmuje omówienie przez mgr Magdalenę Ostafin wielokierunkowego oddziaływanie NETs na funkcjonowanie układu immunologicznego. Ostatnia część „Wstępu” dotyczy ostrych białaczek u dzieci i uwzględnia epidemiologię, klasyfikację, czynniki rokownicze i podstawowe informacje dotyczące leczenia tych chorób. We „Wstępie” dla zachowania płynności rozważań brakuje mi krótkiego powiązania części dotyczącej granulocytów obojętnochłonnych z częścią dotyczącą ostrych białaczek np. w postaci podkreślenia zaburzeń odporności, które są ściśle związane z przebiegiem tych

chorób i istotnym powikłaniem zwłaszcza w okresie leczenia (co Autorka trafnie wyeksponowała w „Celu pracy” i podsumowała w „Streszczeniu”). Estetyczne ryciny, tabele i schematy pozwalają na czytelne zapoznanie się z prezentowanymi zagadnieniami i urozmaicają tekst pracy. „Wstęp” należy ocenić jako przejrzysty, oparty o współczesną wiedzę kliniczną i aktualne piśmiennictwo naukowe, co stanowi dobrą podbudowę do sformułowania celu pracy.

„Cel pracy”, opisany w pięciu podpunktach, sprowadza się do oceny uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych u dzieci chorych na ostre białaczki przed wdrożeniem i w trakcie leczenia, gdy czynność układu odpornościowego jest szczególnie upośledzona, dodatkowo z uwzględnieniem epizodów ciężkich infekcji. Mgr Magdalena Ostafin jasno określiła postawione zadania badawcze uzasadniając celowość eksperymentu, co potwierdza umiejętność wytyczenia właściwej koncepcji badawczej.

W rozdziale „Materiały i metody” (podrozdział „Materiał biologiczny”) Doktorantka opisuje dwie grupy badane, o wystarczającej na potrzeby analizy statystycznej liczebności: grupę dzieci chorych na ostre białaczki, leczonych w Klinice Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dzieci zdrowe, skierowane do poradni przyszpitalnej w celu przeprowadzenia rutynowych badań kontrolnych, co istotne w podobnym przedziale wiekowym. Mgr Magdalena Ostafin podaje również kryteria wykluczenia pacjentów z grupy badanej. Charakterystykę kliniczną chorych (typ białaczek ostrych) i podstawowe dane demograficzne (wiek, płeć) Doktorantka zestawiała w tabeli (tab. 8 str. 66), przy czym zdecydowanie dominowały dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (38 ALL/9 AML), co jest zgodne z profilem występowania tego typu nowotworów. Trzeba przy tym zauważyć, że rozrzut wieku dzieci w obu grupach jest dość duży (od 8 miesięcy do 16 lat), a w grupie dzieci chorych na ostre białaczki znalazło się blisko dwukrotnie więcej dziewczynek niż chłopców (30/17), podczas gdy w grupie dzieci zdrowych ta proporcja jest zrównoważona (14/16). W przyszłości (po zebraniu większej ilości materiału) mogłoby to stymulować do stworzenia dodatkowych grup wiekowych, jak również potwierdzić różnice obserwowane ze względu na płeć. Moim zdaniem warto byłoby sprecyzować, dlaczego badano granulocyty po 30-37 dniach od wdrożenia leczenia (czas chemioterapii niezbędnej do indukcji remisji ?).

Zgodnie z obowiązującymi wymogami, badania uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (załączono stosowne dokumenty).

Procedury związane z pobieraniem i przechowywaniem materiału do badań, jak również procedury opisujące sposób przeprowadzenia eksperymentów zostały opisane przejrzysto i bardzo szczegółowo. Warto podkreślić, iż Autorka ze starannością zadbała o sprawdzenie czystości izolowanej populacji granulocytów metodą cytometrii przepływowej, jak również o ocenę żywotności komórek w barwieniu z użyciem błękitu trypanu oraz w oparciu o ocenę odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą cytometrii przepływowej, co pozwoliło zakwalifikować do dalszych badań jedynie próbki o wystarczającej żywotności komórek.

Co do opisu stosowanych odczynników i materiałów zużywalnych (podrozdziały „Odczynniki chemiczne i sprzęt laboratoryjny” oraz „Roztwory chemiczne”), przy tak dużej ilości, dobrym pomysłem jest zestawienie w tabelach.

Ocena statystyczna uwzględnia charakter rozkładu badanej cechy, a następnie właściwą analizę w oparciu o szeroki panel testów statystycznych, adekwatnych dla rozkładu zbliżonego do normalnego lub różniącego się od normalnego.

Na wyróżnienie zasługuje kompleksowość prezentowanych w pracy badań, różnorodność stosowanych metod i technik, co świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez mgr Magdalenę Ostafin. Warto zauważyć, że wybrane metody badań należą do pracochłonnych, trudnych, wymagających dużego nakładu pracy i umiejętności praktycznych zarówno na etapie „ustawiania” metody, jak też wykonania właściwej części eksperymentu i przy interpretacji wyników. Ponadto badania wykonano przy użyciu trzech różnych stymulatorów granulocytów i dla komórek niestymulowanych, przed leczeniem i na różnych etapach leczenia, stąd ilość analizowanych próbek była bardzo duża. Dodatkowo liczba granulocytów obojętnochłonnych u chorych na ostre białaczki jest zwykle niewielka, co może stwarzać trudności metodyczne w kwestii uzyskania odpowiedniej liczby komórek do badań.

Wyniki badań są bardzo szczegółowo przedstawione na 58 stronach, zestawione w tabelach i zilustrowane czytelnymi i dobrze opisanymi rycinami. Poza graficznym

przedstawieniem analizy wyników (tradycyjne „słupki”), na wyróżnienie zasługuje fakt zamieszczenia przez Doktorantkę bogatej dokumentacji w postaci zdjęć z eksperymentów własnych. Bardzo dobrym pomysłem wydaje się wyróżnienie w rozdziale „Wyniki” 6 głównych podrozdziałów, co przy dużej ilości uzyskanych danych pozwala skupić uwagę na poszczególnych założeniach eksperymentu.

W „Dyskusji” na 12 stronach Doktorantka odnosi się do uzyskanych wyników własnych na tle dostępnego piśmiennictwa, dowodząc rzetelnej wiedzy i dociekliwości naukowej. Wiele uwagi poświęca mechanizmom przekazywania sygnału podczas aktywacji granulocytów obojętnochłonnych, co mogłoby tłumaczyć różnice w uwalnianiu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych po stymulacji różnymi związkami. Należy zwrócić uwagę, że mgr Magdalena Ostafin miała wyjątkowo trudne zadanie ponieważ opublikowano niewiele prac dotyczących uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w ostrych białaczkach, a wyniki uzyskane przez różnych badaczy są niekiedy rozbieżne. W celu weryfikacji poszczególnych założeń eksperymentu, Doktorantka odnosi się do nielicznych badań przeprowadzonych w grupie osób dorosłych, nie tylko w ostrych białaczkach, ale też np. w białaczce limfocytowej przewlekłej. Doktorantka krytycznie podchodzi do interpretacji uzyskanych wyników własnych, wskazując na konieczność podjęcia dodatkowych badań (np. zbyt mała grupa dzieci chorych na ostre białaczki mieloblastyczne nie pozwoliła na porównanie uwalniania NETs w białaczkach limfoblastycznych i mieloblastycznych), co świadczy o jej dojrzałości i perspektywnym podejściu do tematu.

Rozprawę podsumowuje 6 wniosków, stanowiących odpowiedź na postawione cele pracy. Doktorantka potwierdziła m.in. zmniejszoną zdolność do uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych u dzieci chorych na ostre białaczki, co może przyczyniać się do ciężkich powikłań infekcyjnych. Ponadto skorelowanie zdolności do uwalniania NETs ze stężeniem cytokin pozwala tłumaczyć upośledzenie funkcji neutrofilii obniżonym stężeniem wybranych cytokin. Niewątpliwie nowym aspektem badań Doktorantki jest stwierdzenie obniżenia uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych podczas leczenia ostrych białaczek. Co do Wniosku nr II, dotyczącego różnic w tworzeniu NETs w grupach chłopców i dziewcząt, należałoby go traktować jako wstępny z uwagi na niewielką liczebność szczególnie grupy chłopców.

Bibliografia jest bardzo obszerna i obejmuje 217 pozycji, w około 30 % pochodzących z ostatnich 5 lat (w blisko 50% z lat 2010 - 2017). Autorka korzysta głównie ze źródeł anglojęzycznych, co dowodzi, że prezentowane w pracy informacje są aktualne i oparte o najnowszą dostępną wiedzę. Starsze prace służą udokumentowaniu historii rozwoju badań w danej dziedzinie. Osobiście wolałabym układ alfabetyczny rozdziału „Bibliografia”.


Trudno doszukać się większych błędów natury edycyjnej, gdyż rozprawa jest napisana starannie, poprawnym językiem polskim. Drobne błędy literowe i wymienione w recenzji przykładowe uwagi i nieścisłości dotyczą głównie spraw edytorskich i w żaden sposób nie ujmują wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując ocenianą pracę doktorską pragnę zaznaczyć, iż jest to realizacja dobrze zaplanowanego przez Promotora eksperymentu naukowego. Treść wniosków jest adekwatna do przyjętych założeń i wyznaczonego celu badań. Zastosowane metody badań są nowoczesne i obejmują szeroki panel parametrów, co gwarantuje wiarygodność otrzymanych wyników. Piśmiennictwo użyte do napisania części wprowadzającej i dyskusji jest obszerne, co potwierdza wagę naukową i kliniczną tematu.

Otrzymałą do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo dobrze i podkreślam, iż spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 822 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie magister Magdaleny Ostafin do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję ponadto o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej ze względu na bardzo szeroki panel ocenianych parametrów i kompleksowość przeprowadzonych badań, co przekłada się na dużą wartość poznawczą pracy.

02837

Dr hab. Joanna Osada

Asiunkt Zakładu Diagnostyki Hematologicznej UM w Białymstoku
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
specjalista analityki klinicznej