

dr hab. n.med. Jarosław Baran
Zakład Immunologii Klinicznej,
Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Ostafin pt. „Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przebiegu ostrych białaczek u dzieci”

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. n.med. Urszuli Demkow (promotor pomocniczy Dr hab. n.med. Olga Ciepiela) w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Ostre białaczki stanowią najczęstsze choroby nowotworowe wieku dziecięcego. Częstość zachorowania zależy od rodzaju białaczki i jest największa dla ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL), stanowiących ok. 85% wszystkich zachorowań, ze szczytem przypadającym w okresie od 2-6 lat. Z kolei, ostre białaczki mieloblastyczne (AML) są u dzieci znacznie rzadsze, stanowią ok. 10-15% rozpoznań i występują głównie w okresie niemowlęcym. Mimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w zakresie diagnostyki chorób rozrostowych krwi, opracowania nowych strategii terapeutycznych i niezłych rokowań, zwłaszcza w przypadkach ALL, są to wciąż stany zagrażające życiu małych pacjentów. Dodatkowym czynnikiem obciążającym jest upośledzenie mechanizmów odpornościowych, związanych zarówno z samym procesem chorobowym, jak i stosowaną terapią, co znacznie zwiększa ryzyko wystąpienia poważnych zakażeń i ich powikłań, będących główną przyczyną zgonów w tej grupie chorych.

Na tym tle, w przedstawionej rozprawie doktorskiej mgr Magdalena Ostafin podjęła się oceny tworzenia zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) w przebiegu ostrych białaczek u dzieci. Wybór takiej tematyki badawczej był jak najbardziej uzasadniony, bowiem mechanizmy odporności wrodzonej, obejmujące również aktywność neutrofilów, stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed drobnoustrojami, a proces tworzenia NETs i ich rola w zabijaniu drobnoustrojów, należy do jednych z najważniejszych dotychczasowych odkryć w dziedzinie immunologii w XXI wieku. Sama koncepcja przedstawionych badań jest również wysoce oryginalna i zasługuje na uznanie (w literaturze światowej znalazłem TYLKO jedną publikację i to z połowy 2018 roku, traktującą o tworzeniu NETs u dzieci z AML).

Rozprawa posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Poprzedza ją streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów użytych w tekście, a zamyka załącznik zawierający dwie kopie zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej na prowadzenie przedmiotowych badań.

W obszernym wstępie Autorka wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od zdefiniowania odpowiedzi immunologicznej i jej podziału, poprzez charakterystykę neutrofilów i ich funkcji w trakcie toczącego się zakażenia, po szczegółowy opis ostrej białaczki u dzieci. Osobny podrozdział Autorka poświęciła drobiazgowemu opisowi NETs, ich budowie, funkcjom biologicznym, mechanizmom regulującym ich powstawanie oraz ich udziałowi w patomechanizmie chorób człowieka. Cały ten rozdział posiada ogólnie edukacyjny charakter, dodatkowo poparty czytelnymi i kolorowymi schematami i tabelami.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka drobnych mankamentów, głównie natury semantycznej, dostrzeżonych w tej części rozprawy. Autorka definiując odpowiedź immunologiczną używa pojęć „odpowiedź nieswoista” i „odpowiedź swoista”. Te określenia, choć jeszcze funkcjonujące, nie są jednak w pełni właściwe. Obecnie uważa się, iż mechanizmy dawniej zaliczane do „odporności nieswoistej” wykorzystują również swoiste oddziaływania w reakcji gospodarz : patogen i bardziej adekwatne jest używanie, odpowiednio pojęć „odpowiedź wrodzona” i „odpowiedź nabyta”. Również zamienne używanie terminów „wolne rodniki tlenowe” i „reaktywne formy tlenu” w odniesieniu do związków będących pochodnymi tlenu i produkowanych przez neutrofile podczas tzw. wybuchu tlenowego, nie jest do końca poprawne. Tylko bowiem niektóre z reaktywnych form tlenu mają charakter rodnikowy, np. rodnik hydroksylowy, co przytacza zresztą sama doktorantka. Uwagi te mają jednak charakter czysto semantyczny i nie wpływają na wartość merytoryczną tej części rozprawy.

Założenia i cel pracy zostały jasno sformułowane, a podjęte w nich zadania były bardzo ambitne. Doktorantka podjęła się w nich bowiem przeanalizowania całej gamy parametrów, niezależnie od choroby podstawowej, mogących mieć wpływ na tworzenie NETs u pacjentów. I tak, Autorka przyjęła za cel określenie wpływu na tworzenie NETs nie tylko rodzaju ostrej białaczki czy samego leczenia, ale również towarzyszących epizodów zakażenia, różnych cytokin i markerów stanu zapalnego, a nawet płci i wieku pacjentów oraz wartości morfologii krwi w momencie rozpoznania choroby. Wyznaczone cele świadczą o kompleksowym podejściu doktorantki do problemu i chęci dogłębnego zbadania czynników wpływających na tworzenie NETs w przebiegu badanych chorób u dzieci.

Kolejna część pracy to „Materiały i metody”. Przedstawione w nim procedury laboratoryjne są właściwie dobrane a ich opis szczegółowy. Uwagę zwraca bardzo szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, uwzględniający również nowoczesne metody multipleksowe z wykorzystaniem platformy Luminex. Rozdział ten podsumowuje czytelny i klarowny schemat, ilustrujący wszystkie etapy badań i oznaczenia prowadzone na materiale uzyskanym od pacjenta. Moja uwaga do tego rozdziału dotyczy analizy badanej populacji neutrofilów metodą cytometrii przepływowej, a zwłaszcza stosowanych tu układów kontrolnych. W tym kontekście niewyjaśniony jest rodzaj kontroli negatywnej użytej do oceny ekspresji antygeny CD15 (Rycina 7) i do oceny wiązania aneksyny V-FITC (Rycina 8). Sam opis Ryciny 7 jest również nieco mylący - przy opisie cytogramu B pojawia się informacja o prezentacji na nim komórek względem ekspresji antygeny CD15 i CD45, podczas gdy wykres odnosi się do ekspresji antygenów CD15 i CD33. Z punktu widzenia czytelnika, mało informatywne jest podawanie przez Autorkę w metodyce badań objętości używanych odczynników, np. przeciwciał mono- i poliklonalnych, aneksyny V czy czynników stymulujących tworzenie NETs i innych, zamiast podawania wartości ich stężenia bądź końcowego rozcieńczenia dla przeciwciał, np. 1:100. Są to wszystko jednak drobne usterki, dotyczące głównie aspektów technicznych wykonywanych badań.

Kolejny rozdział – „Wyniki”, to najobszerniejsza część pracy. Tę część doktorantka rozpoczyna od oceny poziomu tworzenia NETs przez neutrofile dzieci chorych i zdrowych pod wpływem 3 różnych stymulatorów, w 4 różnych punktach czasowych. Identyfikację NETs doktorantka prowadziła dwiema niezależnymi metodami, tj. metodą fluorymetryczną, oceniając poziom wyrzucanego DNA w nadsączach z hodowli komórkowych oraz techniką mikroskopii fluorescencyjnej, identyfikując pojedyncze komórki produkujące NETs. Uzyskane wyniki Autorka zestawiała na rycinach i w tabelach, podkreślając najbardziej istotne różnice. Wyniki te jednoznacznie wskazują, iż zdolność neutrofilów do tworzenia NETs w warunkach *in vitro* zależy od rodzaju użytego aktywatora. W przypadku PMA i fMLP, we wszystkich badanych punktach czasowych poziom uwalnianego przez neutrofile DNA był wyraźnie niższy w przypadku komórek pochodzących od pacjentów w porównaniu z grupą zdrowych dzieci.

W kolejnym etapie doktorantka porównała tworzenie sieci neutrofilowych u pacjentów z rozróżnieniem na rodzaj ostrej białaczki, ALL vs AML, a następnie, z podziałem na płeć pacjentów. I tak, rodzaj ostrej białaczki nie miał wpływu na zdolność neutrofilów do tworzenia NETs, natomiast neutrofile izolowane od chorych chłopców uwalniały mniej DNA niż komórki pochodzące od chłopców zdrowych, czego nie wykazano w odniesieniu do grupy dziewczynek. Efekt ten obserwowano bez względu na rodzaj użytego aktywatora tworzenia sieci i może on tłumaczyć zwiększoną podatność na infekcje i ogólnie gorsze rokowanie dla chorych chłopców. W mojej opinii, szczególnie interesujące są wyniki pokazujące silniejsze uwalnianie DNA przez neutrofile izolowane od chorych dziewczynek w porównaniu do neutrofilów izolowanych od chorych chłopców, zwłaszcza iż zależności takiej doktorantka nie stwierdziła w stosunku do dzieci zdrowych. Choć dane te we wszystkich punktach czasowych były statystycznie istotne tylko dla jednego aktywatora tworzenia sieci, tj. jonoforu wapnia, to korelują one z wynikami uzyskanymi dla całej grupy pacjentów, w której dominowała populacja dziewczynek. Ta bez wątpienia oryginalna obserwacja może być przyczynkiem do dobrej publikacji doktorantki z tego tematu.

W przedstawionym zestawieniu wyników dwóch metod badawczych zastanawia brak wartości liczbowych komórek tworzących sieci w analizie mikroskopowej, co uniemożliwia korelację z wynikami badań fluorymetrycznych np. w celu weryfikacji czy uwolnione DNA, wykrywane metodą fluorymetryczną, w istocie pochodzi z procesu netozy a nie np. nekrozy wywołanej toksycznym działaniem użytych aktywatorów. Choć sama Autorka stwierdza, iż „wyniki analizy jakościowej (czytaj badań mikroskopowych) nie potwierdzają jednoznacznie wyników analizy ilościowej (fluorymetrycznej)” (str.94), to ocena mikroskopowa, pozwala również na ilościowe przedstawienie uzyskanych wyników i ich porównanie z metodą fluorymetryczną.

W dalszych badaniach doktorantka nie stwierdziła różnic w ilości uwalnianego DNA w grupie pacjentów w zależności od rodzaju ostrej białaczki, leukocytozy, liczby samych neutrofilów czy płytek krwi w momencie rozpoznania choroby. Są to bardzo cenne spostrzeżenia, gdyż dotychczas brak jest w literaturze światowej danych na ten temat w takiej grupie pacjentów. W kolejnych zestawieniach doktorantka uwzględniła również wiek pacjentów, który jest jednym z czynników ryzyka dla ALL i AML, nie stwierdzając różnic w uwalnianiu DNA przez neutrofile chorych dzieci w różnych przedziałach wiekowych, choć różnice takie wyraźnie wystąpiły przy analogicznym podziale w grupie dzieci zdrowych. Zdaniem recenzenta, to bardzo ciekawa obserwacja, wskazująca na rodzaj „dojrzewania” neutrofilów do tworzenia NETs i szkoda, iż w tym miejscu doktorantka nie zdecydowała się zamieścić rysunku przedstawiającego te zależności.

Kolejny podrozdział zatytułowany „Uwalnianie NETs na różnych etapach choroby” jest analizą zdolności neutrofilów pacjentów do tworzenia sieci w trakcie leczenia białaczki na etapie indukcji remisji, a także w trakcie wklajającej leczenie infekcji. Porównując dane uzyskane w momencie rozpoznania choroby z wynikami badań na etapie indukcji remisji (dzień 30-37), można stwierdzić, iż wdrożona chemioterapia dodatkowo hamuje zdolność neutrofilów do tworzenia sieci, pogłębiając różnice w stosunku do dzieci zdrowych. W tym zestawieniu, zastanawia wyrażnie wzmożona spontaniczna aktywność neutrofilów pacjentów do tworzenia sieci bez czynników stymulujących (Rycina 19). Wyniki te wymagają osobnego komentarza. Natomiast w analizie tworzenia NETs u pacjentów w trakcie infekcji wskazana byłaby bliższa identyfikacja czynnika chorobotwórczego. Doktorantka wprowadzie zaznacza, iż badania przeprowadzono przed podaniem antybiotyku, ale jaką infekcję, czy bakteryjną czy wirusową przechodzili pacjenci, do końca nie wiadomo. Biorąc pod uwagę, iż stopień uwalniania DNA w trakcie infekcji nie różnił się istotnie w stosunku do ocenianego na etapie rozpoznania choroby, można sądzić, iż były to jednak infekcje wirusowe, w których rola neutrofilów nie jest istotna.

U 4 pacjentów z ALL doktorantka wykonała również badania poziomów uwalniania NETs po allogenicznym przeszczepieniu komórek hematopoetycznych szpiku kostnego i porównała je do tych uzyskanych w chwili rozpoznania choroby. W tym zestawieniu zastanawiające jest, iż w każdym przypadku po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych, poziom tworzenia NETs po stymulacji jonoforem wapnia był wyrażnie niższy niż wyjściowo, w momencie diagnozy. Pozostałe wyniki wykazywały zróżnicowanie w zależności od użytego aktywatora NETs. Dla prawidłowej interpretacji tych danych byłaby istotna informacja, po jakim czasie od wykonania przeszczepienia przeprowadzono badania tworzenia NETs oraz jaki był chimeryzm poprzyszczepowy pacjentów w tym czasie. Bez tych informacji, nie można wykluczyć, iż badań dokonano zanim doszło do pełnej rekonstrukcji układu hematopoetycznego pacjentów, bądź badano neutrofile powstałe w wyniku odnowy autologicznej.

W ostatnim podrozdziale tej części rozprawy doktorantka przedstawiła wyniki bardzo obszernych badań poziomu wybranych markerów stanu zapalnego i szeregu cytokin oraz chemokin w surowicy krwi pacjentów i dzieci zdrowych, korelując je ze zdolnością neutrofilów do tworzenia sieci po stymulacji różnymi aktywatorami. Ze względu na liczbę ocenianych parametrów w różnych punktach czasowych i w zależności od użytego aktywatora, wyciągnięcie z uzyskanych wyników jednoznacznych konkluzji nie było łatwe. Niemniej, doktorantka wykazała, że u dzieci chorych na ostre białaczki stężenia wielu cytokin w osoczu są niższe niż u dzieci zdrowych. Jednocześnie zaobserwowała zmiany w stężeniu badanych cytokin u chorych dzieci zachodzące w trakcie leczenia. Dotyczyło to m.in. IFN γ , PDGF, IL-6. Z kolei, obserwowane zmiany w stężeniu białek ostrej fazy u chorych dzieci nie miały wpływu na tworzenie NETs.

W „Podsumowaniu wyników” doktorantka zwięźle rekapitułuje uzyskane w poszczególnych etapach wyniki badań.

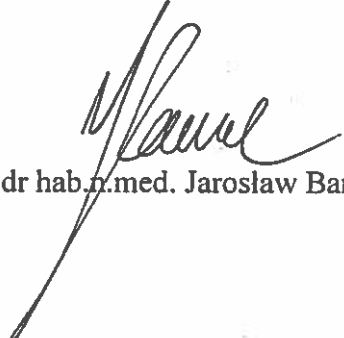
Na uznanie zasługuje również „Dyskusja”. W tej części rozprawy doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością przedmiotu i wnikliwie ustosunkowała się do uzyskanych wyników w kontekście literatury światowej. Ze względu na ograniczoną ilość informacji dotyczących tej tematyki w chorobach limfoproliferacyjnych u dzieci, większość wyników doktorantka zmuszona była dyskutować w zestawieniu z danymi dotyczącymi podobnych badań, ale prowadzonych na materiale klinicznym od osób dorosłych, bądź realizowanych z wykorzystaniem białaczkowych linii komórkowych. Pomimo wielu

podobieństw do analogicznych chorób u osób dorosłych, u dzieci istnieją bardzo istotne różnice, m.in. związane z przebiegiem samej choroby i rokowaniem. W tym kontekście, doktorantka trafnie podkreśla odmienny status immunologiczny dzieci i osób dorosłych, bierze pod uwagę różne metody stosowane w swoich badaniach i badaniach innych grup. Na tle literatury światowej dyskutuje również różnice w tworzeniu NETs w zależności od płci pacjentów, podkreślając odmienny przebieg ostrych białaczek u kobiet i mężczyzn. Wśród możliwych powodów osłabionej zdolności neutrofilów dzieci chorych do tworzenia NETs wymienia proces autofagii i zaburzonej degradacji jądra komórkowego czy zmniejszonej aktywności elastazy neutrofilowej. Te bardzo interesujące koncepcje mogą stać się podstawą do dalszych, pogłębionych badań doktorantki z tego tematu.

Ze swej strony pragnę podkreślić ogromny wysiłek doktorantki włożony w wykonanie i przeanalizowanie wyników tak szeroko zakrojonych badań. Dodatkowo, ich realizacja wymagała od niej dużego zaangażowania i ścisłej współpracy z klinicystami różnych specjalności, co zapewne nie było łatwe. Z tych zadań, w mojej ocenie, mgr Ostafin wywiązała się wzorowo. Ze względu na kompleksowość prowadzonych badań, nie zawsze udało się je w pełni zrealizować w kontekście dostępności materiału klinicznego czy doboru metod badawczych, umożliwiających późniejsze porównanie uzyskanych wyników. Mimo to, przeprowadzone badania dostarczają wartościowych i nowych obserwacji dotyczących tworzenia NETs w przebiegu ostrych białaczek u dzieci. Właściwe ich zestawienie z pewnością zaowocuje dobrymi publikacjami.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Ostafin 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.2016 poz. 882 z póź.zm). Prezentuje ona wyniki oryginalnych badań i jest wartościowym wkładem w rozwój wiedzy na temat funkcjonowania mechanizmów odporności wrodzonej w przebiegu ostrych białaczek u dzieci. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Ostafin do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 10.01.2019



dr hab.n.med. Jarosław Baran