

Kraków, 21.06.2019

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Michała Przemysława Pruchniaka
pt. „Tworzenie i degradacja zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilów w chorobach
autoimmunizacyjnych”**

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. med. Urszuli Demkow
w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

W ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości występowania chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Wspólną cechą tych chorób jest utrata tolerancji immunologicznej organizmu na własne antygeny, prowadząca do rozwoju adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej i w efekcie do wytworzenia określonych autoprzeciwciał, aktywacji autoreaktywnych limfocytów T CD4+ oraz CD8+ wraz z zaangażowaniem wrodzonych składników układu odpornościowego, takich jak białka dopełniacza oraz komórki fagocytarne: makrofagi i neutrofile. W efekcie dochodzi do uszkodzenia danego narządu (choroby narządowo swoiste) lub rozwoju układowych schorzeń autoimmunizacyjnych. Choć etiologia schorzeń autoimmunizacyjnych nie jest w pełni poznana, wiadomo iż w patogenezie tych chorób kluczową rolę odgrywają czynniki genetyczne (niektóre haplotypy HLA są szczególnie istotne w prezentacji autoantygenów w procesach autoimmunizacyjnych i wykazują silną korelację z ryzykiem zachorowania na dane choroby), płeć (ok. 70-80% przypadków dotyczy kobiet) oraz czynniki środowiskowe (przebyte infekcje oraz zanieczyszczenie środowiska), wyzwalające reakcje autoimmunizacyjne.

Na tym tle, w przedstawionej rozprawie doktorskiej mgr Michał Pruchniak podjął się oceny tworzenia i degradacji zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) w przebiegu uogólnionych chorób autoimmunizacyjnych – układowego toczenia rumieniowego (SLE) oraz ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA). Wybór takiej tematyki badawczej był jak najbardziej uzasadniony, bowiem zbyt nasilona produkcja NETs i/lub upośledzona ich eliminacja może być, jak się obecnie uważa, dodatkowym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi autoimmunizacji.

Rozprawa posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Poprzedza ją wykaz skrótów użytych w tekście, a zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 2 załączniki, zawierające kopię zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej na prowadzenie przedmiotowych badań oraz wykaz publikacji i doniesień zjazdowych, w których prezentowano uzyskane wyniki.

W obszernym wstępie autor wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od przytoczenia roli neutrofilów w zdrowiu i chorobie, poprzez drobiazgowy opis mechanizmów zaangażowanych w tworzenie NETs zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, a także roli NETs w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Doktorant kolejno przedstawił zagadnienia i pojęcia, których poznanie jest niezbędne dla zrozumienia zasadności podjęcia tematu badawczego i koncepcji pracy. Napisanie tej części rozprawy wymagało od doktoranta dużo wysiłku, gdyż dotyczy ona różnorodnych zagadnień, których złożenie w logiczną całość nie było łatwe. Doktorant wywiązał się z tego zadania dobrze, ale niekiedy nie zdołał uniknąć pewnych błędów, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. I tak, na str.17 w podrozdziale 1.2.1.3 Mechanizmy tlenowe – wykorzystanie wolnych rodników tlenowych, doktorant pisze, iż „kluczowym enzymem uczestniczącym w tym procesie jest dinukleotyd nikotynadeninowy, zwany oksydazą NADPH”. Jest to błędne sformułowanie gdyż wspomniany dinukleotyd nikotynadeninowy jest substratem dla enzymu - oksydazy NADPH. W tym kontekście nie do końca mogę się również zgodzić z określeniem produktów wybuchu tlenowego, mediowanego właśnie przez oksydazę NADPH, jako „wolne rodniki tlenowe”, ponieważ tylko niektóre z nich mają charakter rodnikowy, np. rodnik hydroksylowy. Bardziej adekwatne byłoby w tym miejscu użycie sformułowania „reaktywne formy tlenu”. Również przy opisie procesu NETozy autor używa pojęcia „programowana śmierć komórki”, co nie jest poprawne, gdyż śmierć komórki towarzysząca procesowi NETozy nie ma charakteru „śmierci programowanej”. Poza tym, co przyznaje sam autor, nie zawsze proces tworzenia NETs, a więc proces NETozy kończy się śmiercią komórki produkującej sieci. W tym aspekcie pomocne byłoby sięgnięcie do rekomendacji Nomenclature Committee on Cell Death z 2018 roku, opublikowanych w czasopiśmie *Cell Death & Differentiation*. Wszystko są to jednak tylko drobne uwagi natury semantycznej i nie umniejszają one wartości merytorycznej tej części pracy, która posiada ogólnie edukacyjny charakter.

Założenia i cel pracy zostały jasno i logicznie sformułowane w kontekście światowego piśmiennictwa z tego tematu. W tym miejscu pragnę podkreślić, iż bardzo istotnym aspektem, podnoszącym rangę przedmiotowych badań było uzyskanie przez mgr Pruchniaka funduszy na ich finansowanie w ramach grantu z Narodowego Centrum Nauki w konkursie Preludium 2. Ten niewątpliwый sukces doktoranta świadczy o wysokim poziomie niniejszych badań i ich uznaniu również przez niezależnych recenzentów zagranicznych.

Kolejna część pracy to „Materiały i metody”. Przedstawione w nim procedury laboratoryjne są właściwie dobrane a ich opis szczegółowy. Drobną niedosyt w prezentowanej metodyce badań budzi brak uwzględnienia w niej tzw. granulocytów o małej gęstości, o których wspomina sam autor we wstępie (str.33), iż to właśnie tej populacji przypisuje się wzmożoną produkcję NETs w przebiegu SLE. Szkoda, iż mając taką możliwość, doktorant nie wykorzystał komórek jednojądrzastych krwi, które również były izolowane, a w obrębie których znajdują się właśnie granulocyty o małej gęstości. Tym bardziej, iż późniejsze wykorzystanie tych komórek z materiału mrożeniowego będzie już niemożliwe.

Rozdział „Wyniki” doktorant rozpoczyna od charakterystyki ilościowej i jakościowej izolowanych neutrofilów, ze szczególnym uwzględnieniem oceny ich żywotności metodą cytometrii przepływowej w oparciu o markery fenotypowe i wiązanie znakowanej fluorescencyjnie Aneksyny V. Wyniki te dokumentują wysoką żywotność izolowanych komórek, tym samym potwierdzając ich przydatność do dalszych testów. Drobnego wyjaśnienia wymaga tu potrzeba oceny ekspresji antygenu CD33, o której autor wspomina w

rozdziale „Materiały i metody” w tabeli 5 (str. 42), a która to ocena nie została w żaden sposób uwzględniona w przedstawionych wynikach. Dalej doktorant prezentuje wyniki analiz poziomu tworzenia NETs przez neutrofile pacjentów z SLE i GPA oraz zdrowych dawców pod wpływem 3 różnych stymulatorów, w 6 różnych punktach czasowych, badając komórki izolowane od tych samych pacjentów zarówno przed leczeniem, jak i w trakcie terapii. Identyfikację NETs doktorant prowadził dwiema metodami, tj. metodą fluorymetryczną, oceniając poziom wyrzuconego DNA w nadsączach z hodowli komórkowych oraz techniką mikroskopii fluorescencyjnej, identyfikując pojedyncze komórki produkujące NETs. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż stopień produkcji NETs zależy od rodzaju użytego stymulatora. I tak, po stymulacji PMA neutrofile izolowane od pacjentów z SLE lub GPA, w każdym badanym punkcie czasowym, uwalniały istotnie więcej DNA niż neutrofile pochodzące od osób zdrowych. W przypadku użycia jako stymulatora fMLP produkcja NETs była najniższa i zbliżona do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej. Użycie jonoforu wapnia powodowało natomiast istotnie wyższy wyrzut NETs przez neutrofile pacjentów z GPA w porównaniu z osobami zdrowymi, a w przypadku pacjentów z SLE wyrzut DNA był na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej. Istotne różnice w tworzeniu NETs zaobserwowano jednak w obrębie obu grup pacjentów po stymulacji PMA i jonoforem wapnia. W obu wypadkach komórki izolowane od pacjentów z GPA produkowały więcej NETs niż neutrofile od pacjentów z SLE. Wprowadzone leczenie sprawiło natomiast, iż uwalnianie DNA z neutrofilów malało do poziomów obserwowanych w grupie zdrowych dawców. Są to obserwacje bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia. Wskazują one bowiem na możliwość wykorzystania oceny tworzenia NETs przez granulocyty pacjentów z autoimmunizacją jako dodatkowego parametru monitorującego skuteczność stosowanego leczenia immunosupresyjnego. W tym kontekście należy żałować, iż doktorant użył obu metod identyfikacji produkcji NETs tylko wybiórczo, a analiza mikroskopowa NETs w przedstawionej formie ma charakter jakościowy a nie ilościowy, co nie pozwala na pełniejszą weryfikację uzyskanych wyników.

W kolejnym podrozdziale doktorant przedstawia dane wskazujące, iż osocze uzyskane od pacjentów posiada istotnie obniżoną zdolność do degradacji uwolnionego w NETs DNA w porównaniu do osób zdrowych. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi. W dalszym etapie badań, szukając przyczyn obniżonej aktywności osocza pacjentów do degradacji DNA doktorant dokonał analizy polimorfizmu genu DNASE I, kodującego kluczowy dla tego procesu enzym DNazę I. Uzyskane wyniki wykazały obecność trzech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, które wg autora mogą być związane z obniżoną aktywnością enzymatyczną DNazy I. W świetle przedstawionych wyników stwierdzenie takie wydaje się jednak nieco „na wyrost”, gdyż brak jest informacji o częstości występowania tych polimorfizmów w grupie badanej oraz czy polimorfizmy te występowały również u osób zdrowych. Aspekt ten wymaga osobnego komentarza.

„Wyniki” kończy podrozdział pt. „Uwalnianie NETs przez granulocyty zdrowych dawców pod wpływem kombinacji stymulatorów”. Zdaniem recenzenta, podjęcie tego wątku badawczego wymaga wyjaśnienia. Wobec bowiem jasno sprecyzowanego celu pracy, niezrozumiała jest istota badań potencjalnego synergistycznego oddziaływania różnych aktywatorów NETs i to w odniesieniu jedynie do komórek zdrowych dawców.

Trzynastostronicowa „Dyskusja” zasługuje na uznanie. W tej części rozprawy, doktorant wnikliwie ustosunkował się do uzyskanych wyników na tle piśmiennictwa światowego. Podkreśla, iż związek pomiędzy NETs a procesem autoimmunizacyjnym został udokumentowany w wielu jednostkach chorobowych, a czynniki takie jak cytokiny czy

indukowane przez NETs przeciwciała ANA/ANCA są z jednej strony związane z zaostreniem chorób, z drugiej inicjują lokalną nadprodukcję NETs. W oparciu o dane literaturowe doktorant przytacza potencjalne mechanizmy prowadzące do wzmożonego uwalniania NETs u chorych na choroby autoimmunizacyjne. Podkreśla również istotną rolę makrofagów i białek osocza, jako głównych czynników zaangażowanych w degradację uwolnionego w NETs DNA komórkowego. Zaburzenia tych mechanizmów stanowią bowiem istotną przyczynę ekspozycji autoantygenów NETs na komórki układu odpornościowego, a obniżoną zdolność degradacyjną osocza względem DNA wykazano w wielu schorzeniach autoimmunizacyjnych. W tym kontekście rola osoczowej DNazy I wydaje się kluczowa. Doktorant dogłębnie analizuje potencjalne przyczyny opisywanej w literaturze upośledzonej aktywności DNazy I u pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi, przytaczając rolę białka C1q układu dopełniacza jako inhibitora tego enzymu (obecność inhibitora DNazy I w osoczu, koreluje bowiem u pacjentów z SLE z poziomem autoprzeciwciał ANA) czy mutacji genomowych oraz polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, wpływających na jego aktywność. Dane te konfrontuje z wynikami przeprowadzonych przez siebie analiz, podkreślając iż zależność pomiędzy występowaniem wykrytych zmian polimorficznych (zwłaszcza substytucji w rejonie intronowym graniczącym z 3 egzonem) w genie dla DNazy I a defektem czynnościowym tego enzymu wymaga dalszych pogłębionych badań.

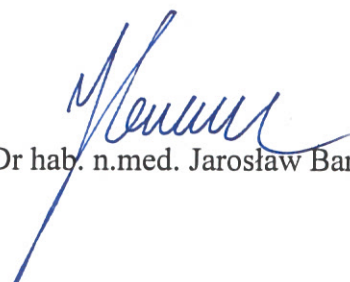
Osobne miejsce w tym rozdziale zajmuje przedyskutowanie zastosowanego modelu badawczego, ze szczególnym uwzględnieniem optymalizacji technik pomiaru tworzenia NETs. Doktorant wskazuje na istotne aspekty metodyczne i rozwiązania, które musiał wprowadzić w celu zminimalizowania ograniczeń stosowanych metod. Krytycznie ustosunkowuje się do metody mikroskopowej oceny NETs i jej mankamentów, które sprawiły, iż finalnie nie została ona zastosowana równoległe z metodą fluorymetryczną. Doktorant szeroko dyskutuje również wyniki uzyskane z użyciem różnych aktywatorów tworzenia NETs, podkreślając różnice w ich mechanizmach działania na komórkę. W tym kontekście argumentuje zastosowanie schematu aktywacji neutrofilii z użyciem dwóch a nawet trzech różnych stymulatorów. Tej argumentacji zabrakło mi w rozdziale „Wyniki”, gdzie doktorant opisuje „Uwalnianie NETs przez granulocyty zdrowych dawców pod wpływem kombinacji stymulatorów”, choć niejasnym pozostaje nadal ograniczenie tych badań tylko do grupy zdrowych dawców.

Poprawnie wyciągnięte „Wnioski” rekapituluje wyniki badań. Piśmiennictwo obejmujące 174 pozycje to starannie dobrane publikacje. Spośród licznych cytacji, wiele odnosi się do najnowszych artykułów opublikowanych w roku 2018 a nawet 2019.

Na zakończenie swojej recenzji pragnę podkreślić, iż przedłożone opracowanie jest interesujące, tak z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia. Przedstawione wyniki potwierdzają dane literaturowe, dotyczące związku NETs z rozwojem chorób autoimmunizacyjnych. Dotychczas brak jest w literaturze danych co do różnic w tworzeniu NETs między chorymi na poszczególne jednostki chorobowe, co doktorant przyjął za jeden ze swoich celów badawczych. Ten aspekt jest w pełni nowatorskim elementem przeprowadzonych badań i zasługuje na szczególne uznanie, a fakt przyjęcia do druku powstałych na bazie niniejszej rozprawy dwóch publikacji oryginalnych, z czego jednej do czasopisma „Autoimmunity”, dodatkowo weryfikuje jej wysoką wartość.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Przemysława Pruchniaka 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 z dnia 3 lipca 2019r Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.)”. Prezentuje ona wyniki oryginalnych badań i jest wartościowym wkładem w rozwój wiedzy na temat patomechanizmów chorób autoimmunizacyjnych. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Michała Przemysława Pruchniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n.med. Jarosław Baran