

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

**mgr Michała Przemysława Pruchniaka**

**pt. Tworzenie i degradacja zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilów  
w chorobach autoimmunizacyjnych**

Badania przedstawione w pracy doktorskiej rozpoczęto w 2011r tzn wkrótce po wykryciu nowego zjawiska, a mianowicie tworzenia zewnątrzkomórkowej sieci białkowej przez neutrofile. Brinkmann i wsp. w 2004r wykazali, że stymulacja neutrofilów przez PMA powoduje uwalnianie nici chromatynowych zawierających histony i enzymy proteolityczne, a wśród nich mieloperoksydazę (MPO) i proteazę seryny (PR-3). Substancja ta nazwana zewnątrzkomórkową siecią neutrofilów ( Neutrophil Extracellular Trap -NETs) wykazała aktywność w przechwytywaniu i zabijaniu drobnoustrojów Gram+, Gram- u chorych na zakażenia bakteryjne. Chorzy na przewlekłą chorobę ziarniniakową ( *Chronic Granulomatous Disease-CGD*) z neutrofilami pozbawionymi zdolności tworzenia NETs są narażeni na częste zakażenia bakteryjne.

W 2007r Kassenbrock i wsp. wykazali że zjawisko tworzenia NETs dotyczy też chorych na martwicze zapalenia naczyń związane z ANCA (*ANCA Associated Vasculitis-AAV*). U tych chorych udało się uwidocznic obecność sieci białkowej w neutrofilach zlokalizowanych w miejscach zmian naczyniowych i wysokie stężenia NETs we krwi. Jednocześnie wykazano, że enzymy uczestniczące w formowaniu sieci tzn MPO i PR-3 stymulują jej tworzenie, a także , że ANCA mogą stymulować tworzenie NETs przez neutrofile aktywowane uprzednio przez TNF alfa.

Podjęcie więc badań nad aktywnością neutrofilów w zakresie tworzenia NETs u chorych z chorobami autoimmunologicznymi w tym ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (*Granulomatosis with Polyangiitis-GPA*) i toczeń rumieniowaty układowy-(*Lupus Erythematosus Systemicus- SLE*) wydaje się ze wszech miar na czasie.

Praca przedstawiona do recenzji jest starannie opracowanym i oprawionym 105-stronicowym wydrukiem komputerowym. Praca ilustrowana jest własnoręcznie wykonanymi kolorowymi rycinami, mikrofotografiami z części doświadczalnej uwidaczniającymi NETs. Część danych jest umieszczona w 9 tabelach, a wyniki są przedstawione w postaci wykresów.

Praca obejmuje 8 rozdziałów głównych z wieloma podrozdziałami oraz bibliografię ze 174 pozycjami piśmiennictwa, spis treści rycin i tabel, a także streszczenia w języku polskim i angielskim.

Układ i kolejność rozdziałów jest właściwa i zgodna z zasadami przyjętymi przy redagowaniu prac naukowych o charakterze rozpraw doktorskich. Układ pracy jest logiczny, treść kolejnych rozdziałów wynika z treści rozdziałów poprzednich

W obszernym, obejmującym 25 stronic wstępie, Autor charakteryzuje komórkę neutrofila od granulopoezy (włącznie ze schematem etapów rozwoju) aż do omówienia rozmaitych jej aktywności. Bardzo drobiazgowo przedstawiona jest aktywność żarna komórki mimo że w chorobach autoimmunologicznych nie jest to podstawowy aspekt jej aktywności. Informacje o fagocytozie z jej dokładnym przebiegiem są powtórzone w kilku miejscach. Bardzo piękny i ilustratywny schemat wytwarzania rodników tlenowych, tabela podjednostek NADPH, czy bardzo dokładnie omówione białka rodziny Rac wydają się nie mieć dalszych implikacji w zasadniczej części pracy i rozpraszają nieco uwagę czytelnika. Zasadniczy proces formowania NETs został przedstawiony wszechstronnie z piękną ilustracją tego złożonego procesu. Autor przedstawia różne mechanizmy, które warunkują formowanie sieci, przytaczając aktualny stan wiedzy w tym zakresie.

Cel swoich badań określił Doktorant bardzo przejrzyście, wymieniając cztery zadania:

1) ocena intensywności tworzenia NETs u chorych na GPA i SLE przed leczeniem i w trakcie co najmniej rocznego leczenia skojarzonego (kortykoterapia + immunosupresja), 2) ocena degradacji NETs, 3) badanie polimorfizmu genu DNazy I, 4) tworzenie NETs po stymulacji neutrofilów osób zdrowych kombinacjami stymulatorów. Bardzo istotne wydaje się, że ocenie podlegały nie tylko komórki neutrofilowe formujące NETs ale także aktywność enzymatyczna osocza chorych na GPA i SLE w zakresie degradacji zewnątrzkomórkowego DNA.

W rozdziale dotyczącym metodyki obejmującym 17 stron, dokładnie i jasno opisano metodykę od pozyskiwania neutrofilów z pełnej krwi obwodowej -do etapu wizualizacji tworzenia NETs. Zarówno formowanie NETs jak i jej degradację badano metodą fluorymetrii, a jakościowo uzupełniano ją mikroskopią fluorescencyjną. Wyczerpująco scharakteryzowano stymulatory PMA i fMPL oraz CaI uzasadniając ich zastosowanie faktem, że w różnych chorobach dochodzi do aktywacji komórki docelowej przez różne szlaki przekazywania sygnału.

W podrozdziale omawiającym materiał badania, Autor krótko charakteryzuje choroby (ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń -GPA i rumieniowaty toczeń układowy -SLE) i przedstawia mechanizmy, w jakich uczestniczą neutrofile w obu tych chorobach. Niepotrzebnie Autor używa aż 3 skrótów (PZN, AAV i SSV) podczas omawiania zapaleń naczyń związanych z ANCA- ponieważ aktualnie najczęściej stosowanym jest AAV zamiennie z SVV, zwłaszcza, że spośród nich badanie dotyczyło tylko chorych na GPA. Trochę za mało podkreślona jest kluczowa rola neutrofila w GPA, którego aktywacja prawdopodobnie rozpoczyna całą patogenetyczną kaskadę, włącznie z tworzeniem mikroropni i uwalnianiem enzymów. Natomiast w SLE, Autor sugeruje, że występująca w tej chorobie wzmożona apoptoza może być źródłem materiału genetycznego, podobnie jak zmniejszona aktywność DNazy, która może odpowiadać za upośledzenie degradacji zewnątrzkomórkowego DNA

Autor zakwalifikował do badania 26 chorych na GPA i 28 chorych na SLE oraz 67 zdrowych osób. Wśród chorych na GPA było 16 chorych przed wdrożeniem leczenia i 10 chorych w trakcie co najmniej rocznego leczenia skojarzonego (glikokortykosteroid+ lek immunosupresyjny), wśród chorych na SLE było 18 chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą i 10 chorych w trakcie leczenia skojarzonego.

Neutrofile wszystkich badanych były stymulowane oddzielnie każdym z trzech stymulatorów, a w wybranej 30 osobowej grupie przeprowadzono stymulację neutrofilów różnymi kombinacjami stymulatorów.

W rozdziale Wyniki przedstawiono przede wszystkim satysfakcjonującą efektywność (88,8%) i żywotność ( $94,8 \pm 2,6\%$ ) uzyskiwanych neutrofilów. Wyniki zasadniczej części badawczej są zawarte w pięciu zestawach wykresów ilustrujących: 1) kinetykę stężenia DNA uwalnianego do środowiska zewnątrzkomórkowego przez neutrofile pochodzące od chorych na GPA, 2) formowanie NETs przez neutrofile chorych na SLE, 3) porównanie kinetyki formowania NETs między chorymi na GPA i SLE, 4) degradację zewnątrzkomórkowego DNA oraz 5) aktywność kombinacji stymulatorów na neutrofile zdrowych osób. Oznaczenia stężeń przedstawiono w 6 punktach czasowych na osi odciętych, a nasilenia zjawiska formowania sieci na osi rzędnych wyskalowanej co 1000 RFU. Nie podając liczbowych danych ilościowych Autor w legendzie podaje istotność statystyczną różnic (chyba niepotrzebnie, przy pomocy różnych i skomplikowanych symboli) między porównywanymi grupami. Wykresy są na tyle ilustratywne, że danych liczbowych czytelnikowi nie brakuje. Zwłaszcza, że równoległe do wykresów Autor przedstawia fotografie spod mikroskopu ilustrujące utworzoną NETs po stymulacji poszczególnymi stymulatorami.

I tak, Autor wykazał istotne statystycznie nasilone uwalnianie sieci przez neutrofile chorych na GPA i na SLE przed leczeniem w porównaniu z tworzeniem NETs przez stymulowane neutrofile osób zdrowych. Ze streszczenia można się dodatkowo dowiedzieć, że największa różnica nasilenia formowania NETs po stymulacji PMA wynosi 82,5%. Jednocześnie Autor wykazał, że neutrofile pochodzące od wszystkich chorych leczonych nie wytwarzały NETs mimo stymulacji, nie różniąc się od nie stymulowanych neutrofilów osób zdrowych. Na tym etapie Doktorant wyciąga roboczy wniosek, że skojarzone leczenie (GKS+immunosupresant) skutecznie blokuje formowanie NETs. Autor porównał nie stymulowane neutrofile pochodzące od osób zdrowych i te pochodzące od chorych na GPA i SLE w trakcie leczenia, które mimo stymulacji nie tworzyły NETs wykazując duże różnice morfologiczne w badaniu mikroskopowym.

Porównując tworzenie NETs przez neutrofile chorych na GPA i SLE, Doktorant wykazał, że stymulacja przy pomocy zarówno PMA jak i CaI wywoływała istotnie statystycznie większe nasilenie tworzenia sieci przez neutrofile chorych na GPA niż na SLE, co świadczy o różnej kinetyce procesu w tych chorobach. I znowu dopiero ze streszczenia wynika, że neutrofile chorych na GPA wykazywały średnio o 68,5% bardziej nasilone formowanie NETs niż neutrofile chorych na SLE.

Realizacja kolejnego celu polegała na zbadaniu aktywności degradacyjnych osocza chorych na GPA i SLE. Autor zaobserwował, że osocze zarówno chorych na GPA jak i na SLE wykazuje istotnie statystycznie mniejszą aktywność w zakresie degradacji zewnątrzkomórkowego DNA w porównaniu z osoczem osób zdrowych

Autor przeprowadził też analizę sekwencji genu DNASE I wykrywając 3 polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (w tym -opisał jeden nowy polimorfizm), które mogą być związane z obniżoną efektywnością enzymu DNazy.

Końcowe badania dotyczą efektywności stymulacji neutrofilów osób zdrowych przez kombinacje 2 lub 3 stosowanych stymulatorów opierając się na danych, że neutrofile mogą zmieniać funkcje docelowe, gdy działa na nie kilka czynników /bodźców jednocześnie. W obecnym eksperymencie okazało się, że stymulacja 2 lub 3 bodźcami równocześnie wyraźnie osłabiała tworzenie NETs, czyli wywiera efekt zupełnie odwrotny w porównaniu do stymulacji pojedynczym czynnikiem., co zilustrowano kolorowymi fotografiami.

W dyskusji Autor omawia poszczególne etapy pracy z dokładną analizą efektywności stymulatorów oraz przydatność analizy fluorymetrycznej do oszacowania kinetyki tworzenia i degradacji NETs. Dużą część rozdziału zajmuje analiza efektywności DNazy w zakresie degradacji zewnątrzkomórkowego DNA-przy czym analiza dotyczy głównie obecności polimorfizmów. Na uwagę zasługuje fakt, że Autor zidentyfikował kolejny polimorfizm DNazy I.

Na podstawie przeprowadzonych badań i analizy uzyskanych wyników Autor formułuje następujące wnioski: 1) u chorych na GPA i SLE można uwidocznic formowanie NETs istotnie intensywniejsze niż u osób zdrowych, 2) tworzenie NETs jest istotnie bardziej nasilone u chorych na GPA, 3) neutrofile chorych na GPA i SLE poddanych przedłużonemu leczeniu skojarzonemu nie formują NETs mimo stymulacji, co może świadczyć o blokującym działaniu stosowanego leczenia na zjawisko NETozy. Wykazano też istotnie statystycznie mniejszą aktywność degradacyjną osocza chorych na GPA i SLE w stosunku do zewnątrzkomórkowego DNA o około 20% w porównaniu ze zdrowymi. Nieefektywna stymulacja neutrofilów dwoma lub trzema stymulatorami jednocześnie skłoniła do zaproponowania hipotezy, że istnieją wewnątrzkomórkowe mechanizmy chroniące komórkę przed nadprodukcją NETs

Od strony redakcyjnej praca nie budzi zastrzeżeń. Jest wolna od istotnych uchybień merytorycznych. Oparta jest na odpowiedniej liczbie przypadków z prawidłowo prowadzoną metodyką badania, co pozwoliło zrealizować postawione cele pracy i sformułować logiczne wnioski. Wnioski wynikające z pracy mają znaczenie praktyczne, uzupełniając wiedzę na temat aktywności neutrofilów w chorobach autoimmunizacyjnych. Udowodnienie, że komórki te formują NETs mogąc być są bardziej efektywnymi w walce z drobnoustrojami, a jednocześnie doprowadzając się do śmierci (NETozy) stanowiąc materiał autoimmunogeny, znacznie wzbogaca nasza wiedzę o tych chorobach. Jednocześnie można wnioskować dalej, że wygaszenie aktywności neutrofilów w zakresie tworzenia sieci zewnątrzkomórkowych białek ze zdolnością do wychwytywania i zabijania bakterii, mogą być przyczyną ciężkich infekcji u chorych długo leczonych immunosupresyjnie.

Podczas zapoznawania się z pracą towarzyszyło mi wrażenie wyraźnej dysproporcji między ogromem wiedzy biomolekularnej na poziomie struktur komórkowych, cytokin, enzymów, sygnałów między tymi strukturami, a znacznie uboższą wiedzą kliniczną, której doktorant z definicji nie może w tym samym stopniu posiadać. Te dysproporcje między perfekcyjnym warsztatem laboratoryjnym, a niedoskonałością w zakresie problemów klinicznych jest widoczna zarówno we wstępie jak i w dyskusji. Obydwie choroby, mimo stale odbywającego się postępu nauki, stanowią niewiadomą w wielu aspektach, więc każdy przyczynek poszerzający zakres wiedzy – jest istotny. Z punktu widzenia klinicysty brakuje mi chociażby korelacji nasilenia formacji NETs ze stężeniem ANCA. Rażą też niektóre sformułowania jak np. „naciekanie tkanek lub narządów” (str.33) podczas gdy narządy składają się z tkanek, „unicestwiają internalizowany patogen” ( str.15), „ ilość komórek” zamiast „liczba komórek” na str.12. Przed publikacją pracy, do czego bardzo zachęcam, konieczna byłaby współpraca z klinicystą

Podsumowując, praca jest zdecydowanie wartościowa. Stanowi istotny przyczynek dla pogłębienia wiedzy nie tylko o patomechanizmach chorób autoimmunizacyjnych ale także o walce z zakażeniami u tych chorych. Stanowi istotny wkład do literatury i praktyki klinicznej. W pełni zasługuje na pozytywną ocenę. Pojedyncze uwagi redakcyjne, czy językowe, a zwłaszcza zaskakujące podanie wyników tylko w streszczeniu stanowią jedynie przyczynek do dyskusji w ramach obrony.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r 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. I ustawy z dnia 3 lipca 2019r. Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. Z 2018r, poz.1669 z późn.zm.). Wobec powyższego wnioskuję o dopuszczenia mgr Michał Przemysław Pruchniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co wnoszę do Rady Naukowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

*Ewelina Wiatr*