

Recenzja pracy doktorskiej mgr analityki medycznej Marceliny Żabińskiej

**„ROLA KOMÓREK T-REGULATOROWYCH ORAZ TH17 W
MEDIOWANIU REAKTYWNOŚCI AUTOIMMUNOLOGICZNEJ U
PACJENTÓW Z TOCZNIOWYM ZAPALENIEM NEREK”**

Toczeń rumieniowaty układowy jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej. Zażycie nerek występuje u znacznej części chorych. Mimo intensywnie prowadzonych badań przyczyny choroby nie są do końca poznane. Podłożem rozwoju tocznia układowego są zaburzenia regulacji reakcji odpowiedzi immunologicznej. Utrata tolerancji, zaburzenia procesu apoptozy i procesów immunologicznych prowadzi do aktywacji i ekspansji autoreaktywnych limfocytów z konsekwencjami w postaci prezentacji własnych antygenów przez komórki prezentujące antygen. Obserwowane w toczniu układowym liczne zaburzenia aktywacji limfocytów T i B oraz zmiany środowiska cytokinowego i zaburzenia usuwania i odkładania kompleksów immunologicznych prowadzą do uszkodzeniem tkanek.

Dziewicze komórki T CD4⁺ po napotkaniu specyficznego antygeny ulegają aktywacji i różnicowaniu między innymi w kierunku limfocytów T pomocniczych Th1 i Th2, limfocytów Th17 i limfocytów T regulatorowych (Treg). Komórki T regulatorowe odgrywają istotną rolę w hamowaniu zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej i modulują aktywność komórek autoreaktywnych. Wskaźnikami identyfikującym limfocyty T regulatorowe są: występowanie jądrowego czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i nie występowanie antygeny CD 127. Natomiast limfocyty Th17 – subpopulacja komórek T produkują cytokiny (w tym IL-17) zaangażowane w patogenezę różnych chorób autoimmunologicznych oraz w mechanizmy obronne gospodarza wobec zakażeń bakteryjnych. W odpowiedzi immunologicznej uczestniczą również limfocyty T CD8⁺ produkujące IL-17, nazwane Tc17.

Równowaga między prozapalnymi komórkami T (Th17 i Tc17) i limfocytami T regulatorowymi (Treg) jest niezbędna do zachowania tolerancji immunologicznej i zapobiega chorobom autoimmunologicznym.

Prawidłowa aktywacja i różnicowanie naiwnych komórek T CD4⁺ w pomocnicze komórki efektorowe wymaga współistnienia wielu sygnałów m.in. cytokin. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych, a także w badaniach klinicznych stwierdzono, że tzw. środowisko cytokinowe jest czynnikiem decydującym o losie komórek efektorowych.

Limfocyty Treg i Th17 powstają w sposób wzajemnie wykluczający się. Różnicowanie w kierunku limfocytów Treg następuje w obecności TGF-β oraz IL-2. Do powstania limfocytów Th17 niezbędne są IL-1β, IL-6, IL-21, IL-23 i TGF-β.

Limfocyty T CD8⁺ odgrywają kluczową rolę w rozpoznawaniu i usuwaniu komórek zakażonych przez wewnątrzkomórkowe patogeny i mają znaczenie w odpowiedzi przeciwnowotworowej. W większości chorób autoimmunologicznych stwierdza się zwiększenie liczby limfocytów T CD8⁺CD28⁻, które wykazują działanie wysoce cytotoksyczne i uczestniczą w odpowiedzi autoimmunologicznej.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ. Liczy 158 stron, w tym 15 rycin i 48 tabel. Załączono także streszczenie w języku polskim i angielskim. Spis dobrze dobranego i właściwie przytoczonego piśmiennictwa (292 pozycji) jest zamieszczony przy końcu pracy, po streszczeniach w języku polskim i angielskim.

W obszernym, ciekawie napisanym wstępie Doktorantka przedstawiła problematykę czynników patogenetycznych tocznia układowego. Autorka następnie przeszła do omówienia znaczenia poszczególnych subpopulacji limfocytów w patogenezie tego schorzenia. Wstęp kończy szczegółowa charakterystyka cytokin, których zaburzenia wytwarzania mogą uczestniczyć w rozwoju tocznia układowego. Wstęp rozprawy doktorskiej jest starannie napisany i dowodzi szerokiej wiedzy Doktorantki.

W oparciu o przesłanki przedstawione we wstępie został sformułowany cel rozprawy, którym była ocena u chorych z toczniowym zapaleniem nerek mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej w powiązaniu z komórkowymi mediatorami efektorowymi, w tym ocena liczebności populacji komórek regulatorowych (Treg) i limfocytów CD3⁺CD8⁺CD28⁻, liczebności i funkcjonalności komórek Th17 i Tc17 oraz określenie użyteczności pomiarów stężeń w surowicy czynników potencjalnie związanych z badanymi populacjami komórek, tj: CD40L, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22, IL-31, IL-33, TNF-α oraz IFN-γ.

Biorąc pod uwagę wieloletnie zainteresowania zarówno Kierownika Kliniki prof. Mariana Klingera jak i promotora prof. Magdaleny Krajewskiej obecna rozprawa doktorska jest kontynuacją i poszerzeniem wiodących tematów naukowych Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Podjęty przez mgr

analitiky medycznej Marcelinę Żabińską temat porusza istotne zagadnienia w patogenezie toczniowego zapalenia nerek i jest trafny, z punktu widzenia poznawczego.

Badaniami objęto 54 chorych (w tym 96% kobiet) na toczeń rumieniowaty układowy z zajęciem nerek w średnim wieku 36 lat. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 19 zdrowych ochotników (w tym 89% kobiet).

W rozprawie przejrzystość i szczegółowo scharakteryzowano grupy badane, co wskazuje na dobrą znajomość podejmowanej w pracy tematyki.

U wszystkich osób objętych badaniem oceniono m.in. za pomocą cytometrii przepływowej liczebność limfocytów T o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^+CD127^-$ oraz komórek T $CD8^+$ o fenotypie $CD8^+CD28^-$ i $CD8^+CD28^+Foxp3^+$ jak i liczebność populacji komórek Th17 oraz Tc17.

Ponadto wykonano badanie stężeń w surowicy cytokin związanych z rozwojem i aktywacją poszczególnych subpopulacji limfocytów T: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, sCD40L, TNF- α i IFN- γ . Pomiary stężeń powyższych cytokin dokonano testem opartym o system macierzy zawieszinowych. Otrzymane wyniki zostały przeanalizowane w kontekście aktywności choroby mierzonej za pomocą skali SLEDAI oraz rSLEDAI, a także czynności nerek i nasilenia stanu zapalnego (ocenianego przy pomocy oznaczania stężenia białka C-reaktywnego w surowicy).

Metodyka badań i sposób analizy statystycznej nie budzą istotnych zastrzeżeń. Jedynie pewne wątpliwości może budzić zastosowanie do szacowania przesączania kłębuszkowego wzoru autorstwa Cockcroft-Gault, a nie obecnie powszechnie stosowanych wzorów MDRD czy też CKD-epi. Tym niemniej wybór wzoru szacowania przesączania kłębuszkowego nie wydaje się mieć istotnego wpływu na uzyskane przez Doktorantkę wyniki.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje w sposób uporządkowany uzyskane wyniki analizując i porównując kolejno badane grupy pod względem badanych parametrów.

U chorych na toczniowe zapalenie nerek Autorka stwierdziła niższą liczbę komórek regulatorowych (Treg) o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ w porównaniu z osobami zdrowymi. Zaobserwowano także ujemną korelację liczby limfocytów $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ z wartościami współczynnika SLEDAI. W grupie, w której obserwowano objawy nerkowe (rSLEDAI = 4-16), Autorka wykazała niższą liczbę komórek regulatorowych o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ w porównaniu z grupą bez objawów ze strony nerek.

Autorka stwierdziła niższą liczbę komórek regulatorowych o fenotypie $CD4^+CD25^+CD127^-$ u chorych na toczniowe zapalenie nerek w porównaniu z osobami zdrowymi.

Analizując związek pomiędzy liczbą komórek regulatorowych o fenotypach $CD4^+CD25^+CD127^-$ oraz $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Autorka stwierdziła występowanie znamiennej dodatniej korelacji pomiędzy liczebnością powyższych komórek we krwi

Chorzy na toczniowe zapalenie nerek i osoby zdrowe nie różniły się liczbą komórek Th17 i Tc17. Natomiast chorzy na toczniowe zapalenie nerek charakteryzowali się niższą intensywnością immunofluorescencji limfocytów Th17 i Tc17, co wskazuje na niższą ilość IL-17 wytwarzanej przez pojedynczą komórkę. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka u chorych na toczniowe zapalenie nerek stwierdziła niższą wartość stosunku liczby komórek Treg/Th17 w porównaniu do osób zdrowych.

W pracy Doktorantka wykazała u chorych na toczniowe zapalenie nerek wyższą liczbę limfocytów $CD3^+CD8^+CD28^-$ w porównaniu do osób zdrowych. Wyższa liczba limfocytów $CD3^+CD8^+CD28^-$ występowała u chorych z aktywną chorobą (SLEDAI ≥ 5) w porównaniu z grupą nieaktywną (SLEDAI < 5). Na podkreślenie zasługuje fakt, że powyższa obserwacja dotycząca liczby limfocytów $CD3^+CD8^+CD28^-$, jest w pełni oryginalna i nie była jak dotąd opublikowana w dostępnym piśmiennictwie.

W ocenianej pracy u chorych z toczniowym zapaleniem nerek wykazano wyższe stężenia IL-31, IL-33 oraz sCD40L w surowicy w porównaniu z osobami zdrowymi.

Dyskusja prowadzona bardzo ciekawie zawiera rzeczową i samodzielną interpretację wyników, a Doktorantka skonfrontowała własne wyniki z rezultatami innych autorów i gdzie było to możliwe spróbowała znaleźć wytłumaczenie istniejących rozbieżności. W dyskusji autorka podała również informacje dotyczące ograniczeń wykonanego badania.

Rozprawę kończy 6 wniosków, których treść jest zgodna z celami pracy.

Piśmiennictwo obejmuje prace do 2014 roku, które są prawidłowo dobrane i odpowiednio cytowane w tekście.

W mojej opinii rozprawa zawiera drobne niedoskonałości o charakterze głównie edytorskim. Wykaz cytowanych prac nie został przygotowany w sposób jednolity. Ponadto w powyższym wykazie stwierdza się błędy typograficzne. W streszczeniach nie podano charakterystyki badanych grup.

Powyższe niedoskonałości w żadnej mierze nie wpływają jednak na wysoką ocenę rozprawy.

Oceniając pracę, należy podkreślić umiejętność skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi. Z merytorycznego punktu widzenia wyrażam opinię, że oceniana rozprawa stanowi istotny wkład do wiedzy o patogenezie toczniowego zapalenia nerek. Praca jest dobrym opracowaniem odpowiednio dobranego materiału klinicznego z zastosowaniem

adekwatnych narzędzi badawczych. Ponadto poza opisanymi powyżej niedoskonałościami rozprawa została poprawnie opracowana pod względem edytorskim. Jest napisana ładnym językiem.

Mam nadzieję, że niedługo praca ta będzie opublikowana w czasopiśmie naukowym, aby umożliwić szerszemu gronu badaczy zapoznanie się z tymi interesującymi wynikami.

Autorka dowiodła zdolności prowadzenia oryginalnych badań klinicznych oraz wykazała się dobrym przygotowaniem merytorycznym i umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych.

Kończąc pragnę jeszcze raz podkreślić istotne walory poznawcze wykonanych badań i ich nowoczesność.

Rozprawa doktorska mgr analityki medycznej Marceliny Żabińskiej spełnia ustawowe wymogi uzyskania stopnia naukowego doktora.

Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr analityki medycznej Marceliny Żabińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

9364437
Dr hab. n. med. Marcin Adamczak
Specjalista chorób wewnętrznych
Specjalista nefrolog

dr hab. n. med. Marcin Adamczak