

Łódź, dn. 10.12.2024 roku

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne lekarza Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej
„Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofili w krwi i drogach oddechowych
u chorych na POChP”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Górskiej w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z Ośrodkiem Diagnostyki Laboratoryjnej Chorób Układu Oddechowego Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UCK WUM.

Rozprawa jest spójnym zbiorem tematycznym trzech artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się na liście JRC i wysoko punktowanych w strukturze oceny Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Doktorantka jest pierwszym Autorem trzech prac: Mycroft K, Krenke R, Górka K. Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Sep;8(8):2565-2574. doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017, Mycroft K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Nejman-Gryz P, Krenke R, Górka K. Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma. *Cells.* 2023 Jun 15;12(12):1631. doi: 10.3390/cells12121631 i Mycroft K, Proboszcz M, Paplińska-Goryca M, Krenke R, Górka K. Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma-An exploratory study. *J Cell Mol Med.* 2024 Oct;28(20):e70110. doi: 10.1111/jcmm.70110, a z Oświadczeń Współautorów dołączonych do dokumentacji wynika, że Jej wkład w powstanie publikacji stanowił odpowiednio 60%, 50% i 55%.

Łączna punktacja trzech prac wynosi 380 punktów MEiN i 18,261 IF. Rozprawa posiada formę zszywki, w której trzy wymienione publikacje poprzedzone są wspólnym opisem w języku polskim.

Poniższa recenzja zawiera ocenę wartości merytorycznej całości rozprawy doktorskiej oraz zgodności założeń i tematu z osiągnięciami końcowymi, doboru literatury, metod badawczych, wyników pomiarów oraz ich analizy, a nie stanowi oceny merytorycznej poszczególnych publikacji.

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej jest analiza mechanizmów związanych z rozwojem eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w POChP oraz omówienie możliwego wpływu tego typu zapalenia na przebieg choroby. Przedstawiony temat jest nie tylko istotny z punktu widzenia nauk podstawowych, ale również odpowiada na kliniczne zapotrzebowanie lekarzy.

Eozynofile są istotnymi komórkami immunoeffektorowymi i zapalnymi w wielu jednostkach nozologicznych, w tym w chorobach obturacyjnych płuc. Pełnią różnorodne funkcje, odgrywają rolę w homeostazie i chorobach różnych tkanek. Eozynofile pochodzą z progenitorowych komórek macierzystych w szpiku kostnym, które po osiągnięciu dojrzałości są uwalniane do krwi. W warunkach homeostazy eozynofile pozostają we krwi w stanie spoczynku. Po ekspozycji na mediatory prozapalne (IL-3, IL-5 i GM-CSF) mogą one ulec częściowej aktywacji przed migracją do miejsc zapalenia. IL-5 jest jedną z głównych cytokin zaangażowanych w zapalenie za pośrednictwem eozynofili: sprzyja różnicowaniu, przeżywaniu, przemieszczaniu się, aktywacji i funkcjom efektorowym eozynofilów. Migracja eozynofilów do płuc jest kontrolowana przez specyficzne czynniki chemotaktyczne, takie jak CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), CCL11 (eotaksyna 1), CCL13 (MCP-4), CCL15, CCL24 i CCL26 działające na CCR3, wraz z CRTH2, który ulega ekspresji na komórkach pomocniczych Th2. W płucach mediatory prozapalne, w tym białka zasadowe (główne białko zasadowe, białko kationowe eozynofili, peroksydaza eozynofilów i neurotoksyna pochodząca z eozynofili), cytokiny (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-25), chemokiny (CCL5, CCL11, CCL13) i czynniki wzrostu (czynnik martwicy nowotworu [TNF], transformujący czynnik wzrostu [TGF] α/β), uwalniane przez eozynofile, przyczyniają się do rozwoju trwałego stanu zapalnego i uszkodzenia różnych struktur układu oddechowego. Ponadto, limfopoetyna zrębu grasicy, proalergiczna cytokina podobna do IL-7 związana z przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych, może działać na eozynofile, powodując zwiększenie poziomu cytokin zapalnych.

Liczbę eozynofili w płucach można zmierzyć za pomocą oceny tych komórek w płwocinie indukowanej, w płynie z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego (BALF) lub poprzez ilościowe oznaczenie eozynofili w biopsji tkanki płucnej. Warto tu zauważyć, że liczba eozynofili odzwierciedla ilość tych komórek w jednostce objętości lub w jednostce badanego pola, ale nie uwzględnia stopnia ich aktywacji oraz pobudzenia. Stąd, tak cenne są prace naukowe określające profil molekularny i immunofenotyp eozynofilii w różnych płynach ustrojowych oraz tkankach.

W przebiegu POChP liczba eozynofilów jest niestała, jednakże istnieje zależność między liczbą tych komórek we krwi obwodowej, a liczbą eozynofilów w drogach oddechowych. Identyfikacja pacjentów z zapaleniem eozynofilowym może być utrudniona przez heterogenność POChP, stąd diagnostyka różnicowa może odnosić się również do zdefiniowania oraz określenia fenotypu eozynofilowego vs nieeozynofilowego choroby. Eozynofilia nie jest parametrem stabilnym w chorobach obturacyjnych, nie mniej została stwierdzona korelacja pomiędzy odpowiedzią na wziewne glikokortykosteroidy, a liczbą eozynofilów we krwi chorych z zaostrzeniami POChP. Wykorzystanie tego biomarkera w połączeniu z parametrami biochemicznymi oraz molekularnymi z krwi w celu oceny odpowiedzi na leczenie może być przydatnym narzędziem w optymalizacji terapii inhalacyjnej i terapii biologicznej pacjentów z POChP.

Przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej wpisuje się dobrze w nurt badawczy nad rolą eozynofilów w przewlekłych zapalnych chorobach układu oddechowego, a jednocześnie należy stwierdzić, że podjęta tematyka nie jest, jak do tej pory, dostatecznie dobrze poznana.

Oceniana rozprawa zawiera 83 strony maszynopisu, w tym dwie ryciny oraz 104 pozycje piśmiennictwa, nie licząc integralnej części rozprawy, którą stanowią trzy opublikowane, współautorskie artykuły Doktorantki. Praca zawiera: Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wstęp, Założenia i cel pracy, Kopie opublikowanych prac, Podsumowanie, Wnioski, Opinię Komisji Bioetycznej, Oświadczenia współautorów publikacji i Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim. Rozprawę uzupełniają przedstawione w języku polskim i angielskim zwięzłe streszczenia wprowadzające

Czytelnika w problematykę pracy oraz umożliwiające Mu szybkie zapoznanie się z wynikami badań naukowych.

Struktura podziału treści rozprawy w formie zszywkowej, jak również kolejność rozdziałów nie budzą wątpliwości. Tekst jest napisany poprawną polszczyzną i starannie edytowany – znalazłem parę drobnych literówek i kilka niezręczności stylistycznych. Doktorantka nadała chronologiczną numerację stron dołączonych publikacji oprócz oryginalnej numeracji wydawniczej, co znacznie ułatwiło Recenzentowi odszukanie opisywanych zagadnień.

Wstęp, wyczerpujący, napisany został w oparciu o kompletne, bogate i poprawnie dobrane piśmiennictwo, pozwalające na usystematyzowanie faktów dotyczących zagadnień będących przedmiotem rozprawy. Logicznie wprowadza on Czytelnika w jasno sprecyzowany główny cel pracy. Zawiera ogólną wiedzę dotyczącą etiopatogenezy i przebiegu POChP. Na tym tle Doktorantka opisuje zapalenie eozynofilowe w chorobach obturacyjnych płuc i przedstawia naukowe przesłanki do prowadzenia swoich badań doświadczalnych. We Wstępie odnajdujemy podrozdziały dotyczące: Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc, Biologii eozynofilów, Roli eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w patogenezie chorób obturacyjnych układu oddechowego, Eozynofilii obwodowej jako celu terapeutycznego w POChP. Ta część rozprawy zawiera szerokie podejście Doktorantki do materiału opisanego w licznie cytowanych pozycjach piśmiennictwa, świadczące o znajomości prezentowanych zagadnień.

Autorka rozprawy doktorskiej na podstawie danych naukowych opisanych we Wstępie postawiła hipotezę badawczą, która założyła, że eozynofile w POChP we krwi obwodowej oraz w drogach oddechowych różnią się od eozynofilów w astmie ekspresją markerów powierzchniowych i profilem transkrypcyjnym. Powyższe obserwacje pozwoliły Doktorantce zdefiniować cel główny i cele szczegółowe badań składających się na niniejszą rozprawę.

Założenia i cele rozprawy – ocena fenotypu i profilu transkrypcyjnego eozynofilów u chorych na POChP oraz chorych na astmę, przegląd światowej literatury dotyczącej roli eozynofilów w patofizjologii i leczeniu POChP, porównanie ekspresji CD125, CD193, CD14, CD11b, CD62L, CD66b na powierzchni eozynofilów krwi obwodowej, a eozynofilów płwociny indukowanej, porównanie ekspresji CD125, CD193, CD14, CD11b, CD62L, CD66b na

powierzchni eozynofilów krwi obwodowej oraz płwociny indukowanej między chorymi na POChP, astmę oraz grupę kontrolną, ocena związków między ekspresją CD125 i CD193 na powierzchni eozynofilów, a mediatorami szlaku Th2 oraz porównanie profilu transkrypcyjnego eozynofilów krwi obwodowej między chorymi na POChP, a chorymi na astmę, są oryginalnym ujęciem badanego fenotypu eozynofilowego chorób obturacyjnych układu oddechowego. Cele - główny i szczegółowe, jak i zakres badań eksperymentalnych, w powiązaniu z wynikami innych Autorów, zostały w rozprawie opisane w sposób jasny, prosty i czytelny.

Sposób opisu wyników oraz ich dalsza interpretacja wskazuje, że Doktorantka swobodnie i z dużą wiedzą porusza się w tej dziedzinie.

W rozdziale Podsumowanie omówiono i uzasadniono opublikowane wyniki. Doktorantka wykazała się dużą znajomością literatury w omawianej dziedzinie. Cytowane piśmiennictwo zawiera wybrane dane dotyczące przedmiotu badań, w tym również najnowsze pozycje.

Wnioski korespondują z celami pracy. Przedstawione punkty w tym rozdziale zawierają odpowiedź na postawione wcześniej w pracy szczegółowe cele dysertacji. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała sześć wniosków, które stanowią logiczne podsumowanie uzyskanych wyników:

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykazanie różnic między ekspresją wybranych cząsteczek na powierzchni eozynofilów u chorych na POChP i astmę oraz wskazanie genów różnicujących między POChP a astmą.
2. Przegląd literatury światowej szeroko opisuje funkcję biologiczną eozynofilów w warunkach fizjologicznych oraz w patofizjologii i leczeniu POChP. Szlaki immunologiczne związane z eozynofilami mogą prowadzić do rozwoju rozedmy, a eozynofilowy typ zapalenia w drogach oddechowych wiąże się z większym ryzykiem zaostrzeń. Podwyższona liczba eozynofilów, szczególnie ≥ 300 komórek/ μ l, związana jest z lepszą odpowiedzią na glikokortykosteroidy wziewne oraz niektóre leki biologiczne, np.: na dupilumab u chorych z zaostrzeniami.
3. Wykazano, że we wszystkich badanych grupach eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125, CD193, CD62L i CD14 w porównaniu z eozynofilami

- w płwocinie indukowanej, co sugeruje zmianę fenotypu eozynofilów po rekrutacji do dróg oddechowych niezależnie od rozpoznania.
4. W grupie chorych na POChP zaobserwowano wyższy odsetek eozynofilów CD193+ i CD66b+ w płwocinie indukowanej w porównaniu z grupą kontrolną oraz wyższy odsetek eozynofilów CD11b+ w porównaniu z grupą chorych na astmę. Ekspresja CD125, CD62L, CD14 była podobna we wszystkich badanych grupach, zarówno we krwi obwodowej, jak i w płwocinie indukowanej.
 5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją CD125 na eozynofilach w płwocinie lub krwi a stężeniem IL-5 w płwocinie oraz pomiędzy ekspresją CD193 na eozynofilach w płwocinie lub krwi oraz pomiędzy stężeniem eotaksyny-3 w płwocinie. Co więcej, w żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofilów CD125+CD193+.
 6. Analiza mRNA eozynofilów we krwi obwodowej pozwoliła zidentyfikować różnice w profilu transkrypcyjnym pomiędzy POChP a astmą, co może sugerować odmienną funkcję biologiczną eozynofilów w obu jednostkach chorobowych.

Niezwykle wartościowe wydaje się praktyczne przełożenie uzyskanych wyników w przyszłości. Wybrane oraz przeanalizowane przez Doktorantkę fenotypy zapalenia eozynofilowego i markery ze względu na swoją coraz to powszechniejszą dostępność mogą posłużyć wkrótce do wdrożenia bardziej optymalnych schematów terapii pacjentów z POChP i określenia szczególnych grup ryzyka, np.: rozwoju rozedmy, czy zwiększonej częstości zaostrzeń choroby. Wyniki w świetle badań Doktorantki i przytoczonych publikacji zwracają uwagę na rozważenie i spersonalizowane podjęcie decyzji o włączeniu leków biologicznych u chorych na POChP.

Z obowiązku Recenzenta przedstawiam komentarze krytyczne. Chciałbym zwrócić uwagę na pewne aspekty, których zabrakło mi w ocenianej rozprawie:

1. Czytając Wstęp nasuwa się pytanie, według jakiego schematu Doktorantka wybrała markery powierzchniowe CD125, CD193, CD62L i CD14 do badania profilów molekularnych i fenotypów eozynofilów w chorobach obturacyjnych układu oddechowego.
2. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić i szerzej opisać dlaczego fenotypowano eozynofile z płwociny indukowanej, a nie z BALF u chorych na POChP?

3. Nie badano eozynofiliów tkankowych tylko z płwociny indukowanej, zatem, czy zdaniem Doktorantki można stwierdzić, że fenotypy eozynofiliów w mięszu płuca i w świetle dróg oddechowych u chorych na POChP są takie same?
4. Czym Doktorantka tłumaczy brak korelacji pomiędzy ekspresją IL-5 lub eotaksyną-3, a odsetkami subpopulacji eozynofiliów CD125+ (podjednostka α receptora dla IL-5) CD193+ (receptor chemokin C-C typu 3)?
5. Na stronie 21 Doktorantka napisała: „W patogenezie eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych mogą też uczestniczyć szlaki Th2-zależne (ryc. 1)” – przy czym Rycina 1, to głównie schemat przedstawiający cykl życiowy eozynofiliów w POChP, a nie diagram opisujący udział różnych komórek i cytokin uczestniczących w mediowaniu zapalenia Th2-zależnego u chorych na POChP, proszę uściślić.
6. Na stronie 31 trzeci i czwarty z celów szczegółowych zawierają się w sobie, więc zdaniem Recenzenta wystarczyłoby w zupełności poprawnie sformułowany Cel szczegółowy nr 4 w tym rozdziale.
7. Zabrakło podrozdziału na temat ograniczeń pracy badawczej, co zawsze jest cennym elementem wskazującym na umiejętności krytycznego spojrzenia na własną pracę badawczą. Proszę o wskazanie takowych ograniczeń.

Przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają rzeczywistej merytorycznej wartości dysertacji.

W podsumowaniu stwierdzam, że przeprowadzone badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej mają cenne walory poznawcze i stanowią istotny przyczynek do pogłębienia wiedzy dotyczącej patofizjologii POChP. Dają one zatem podstawę do opracowania w przyszłości nowych sposobów leczenia POChP, stwarzając możliwość prewencji przebudowy struktur układu oddechowego stanowiącej ciągle nierozwiązany problem terapeutyczny. Jest to szczególnie cenny wynik przeprowadzonych badań naukowych.

Rozprawę doktorską lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej, pomimo kilku uwag krytycznych, oceniam bardzo wysoko. Należy również podkreślić, że wyniki przeprowadzonych badań stanowiących przedmiot niniejszej dysertacji mają znamiona oryginalności w światowym piśmiennictwie i są nowoczesnym rozwiązaniem problemu naukowego będącego wynikiem własnych doświadczeń Doktorantki.

Podjęcie istotnej tematyki badawczej, znaczny nakład pracy wykonanej przez Doktorantkę, Jej wiedza z dziedziny, dobór literatury, umiejętności posługiwania się warsztatem naukowym w pełni upoważniają mnie do stwierdzenia, że przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej pt.: „Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofilów we krwi i drogach oddechowych u chorych na POChP” spełnia kryteria oraz warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązującej Ustawie o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 roku w art. 187 ust. 1 i 2 (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. 2022 poz. 1668).

Niniejszym przedstawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenia lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, korzystając z przysługujących Recenzentowi uprawnień, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Mam zaszczyt przedłożyć niniejszą rozprawę doktorską do uhonorowania, bowiem Autorka wykazała się imponującą ogólną wiedzą teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej, dużą dojrzałością badawczą, pracowitością, starannością i umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz szczegółowego analizowania wyników oraz wniosków. Wyniki tej pracy opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym mają szansę stać się przedmiotem licznych cytowań i dają podwaliny do planowania potrzebnych dalszych badań naukowych.