

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
I KLINIKA CHOROÓB PŁUC, RAKA PŁUC I
CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH

Białystok, 13.01.2025

Opinia
o dysertacji doktorskiej pt.

**„Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofilów we krwi i
drogach oddechowych u chorych na POChP”**

Autorstwa lek. **Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej**

Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Katarzyny Górskiej

Szacuje się, że przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) dotyka nawet 10% osób na świecie w przedziale wiekowym 30–79 lat. W krajach wysoko uprzemysłowionych głównym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi tej choroby pozostaje palenie tytoniu. Wielokrotna ekspozycja na szkodliwe substancje zawarte w wdychanym powietrzu prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego w drogach oddechowych, uszkodzenia tkanki płucnej oraz zmian w strukturze niewielkich naczyń płucnych. POChP to choroba o postępującym, nieodwracalnym charakterze, a jej późna diagnoza i trudności w leczeniu sprawiają, że – według Światowej Organizacji Zdrowia – zajmuje ona trzecie miejsce wśród przyczyn zgonów na świecie. W ostatnich latach badania coraz częściej koncentrują się na identyfikacji biomarkerów, które umożliwiłyby dobór optymalnych, spersonalizowanych terapii dla pacjentów z POChP. Jednym z obiecujących wskaźników jest liczba eozynofilów w krwi obwodowej. Jednak dokładna rola tych komórek w rozwoju i leczeniu POChP wciąż pozostaje przedmiotem żywej dyskusji w środowisku naukowym.

Przedmiot podjętych przez Doktorantkę badań jest ciekawy i uzasadniony - zarówno z

uwagi na aspekty poznawcze, praktyczne, jak i planowanie przyszłych terapii.

Rozprawa składa się z 3-ech publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej o łącznej wartości IF 18,261 i punktach MEIN 380; wraz z piśmiennictwem liczy 83 strony druku. Posiada typowy dla dysertacji doktorskich układ, z wyjątkiem pominiętego opisu dotyczącego materiałów i metod stosowanych w pracy. Wstęp poprzedzony jest spisem treści zawierającym wykaz stosowanych skrótów zawartych w pracy, co ułatwia jej analizę.

We *Wstępie* Autorka omawia fentypy i biologię POChP, zwłaszcza w sposób przejrzysty zagadnienia dotyczące eozynofilów, dotychczas kojarzonych zazwyczaj z astmą oskrzelową. Jednocześnie obrazowo i bardzo przejrzysto omawia podłoże molekularne funkcji eozynofilów w chorobach obturacyjnych, a także eozynofilię obwodową jako cel terapeutyczny w POChP. Bardzo przejrzyste i czytelne ryciny ułatwiają analizę pracy. Poruszane kwestie są bardzo ciekawe i istotne z praktycznego punktu widzenia. Na uwagę zasługuje ciekawe umówienie we wstępie możliwości leczenia biologicznego POChP.

Cele pracy, podane w sposób zwięzły, syntetyczny i logiczny, wypływają z rozważań zawartych we wstępie. Doktorantka sformułowała jako główny cel pracy ocenę fenotypu i profilu transkrypcyjnego eozynofilów u chorych na POChP oraz cele szczegółowe:

1. Przegląd światowej literatury dotyczącej roli eozynofilów w patofizjologii i leczeniu POChP;
2. Porównanie ekspresji CD125, CD193 CD14, CD11b, CD62L, CD66b na powierzchni eozynofilów krwi obwodowej a eozynofilów płwociny indukowanej;
3. Porównanie ekspresji CD125, CD193 CD14, CD11b, CD62L, CD66b na powierzchni eozynofilów krwi obwodowej oraz płwociny indukowanej między chorymi na POChP, astmę oraz grupą kontrolną;
4. Ocena związków między ekspresją CD125 i CD193 na powierzchni eozynofilów a mediatorami szlaku Th2;
5. Porównanie profilu transkrypcyjnego eozynofilów krwi obwodowej między chorymi na POChP a chorymi na astmę.

Materiał do badań stanowili chorzy na łagodną lub umiarkowaną astmę/pochp ,

pacjentów Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od listopada 2020 do lutego 2022 w ramach badania klinicznego o numerze NCT05398133 (ClinicalTrials.gov) prowadzonego w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Uwagą do tej części rozprawy jest fakt, że Recenzent chcąc dowiedzieć się o materiałach i metodach stosowanych w pracy musi sięgnąć do opublikowanych prac, ew. na stronę *www.ClinicalTrials.gov*. W streszczeniu, w spisie treści jak i w innych miejscach brakuje jakichkolwiek informacji o materiałach i metodach pracy. Jednakże w dwóch publikacjach (IF 5,1 oraz 4,3, wcześniej recenzowanych), a także na w/w stronie internetowej Autorka bardzo przejrzystie przedstawiła kryteria włączenia i wyłączenia pacjentów do badań. W obu pracach oryginalnych wykonano analizę porównawczą eozynofili u chorych na POChP oraz na astmę za pomocą cytometrii przepływowej. Scharakteryzowano eozynofile pod kątem występowania wybranych cząsteczek powierzchniowych, a następnie porównano je w dwóch kompartmentach: we krwi obwodowej oraz w drogach oddechowych (w płwocinie indukowanej). Pobieranie krwi obwodowej, indukcję płwociny, izolację eozynofili z krwi i płwociny wykonano powszechnie uznanymi metodami. Wykonano właściwą analizę ekspresji genów związanych z aktywacją eozynofili (RT-qPCR) i ocenę profilu cytokin (ELISA). Jedynym zastrzeżeniem do tej części pracy jest nieco zbyt mała ilość pacjentów włączonych do badań (12 chorych na astmę i 14 chorych na POChP). Jednakże powyższa uwaga nie umniejsza wartości pracy, ponieważ na podstawie metodyki, opisanej szerzej w przyjętych publikacjach do druku, prawidłowo wykonano dalsze części pracy.

Metody badań zastosowane przez Doktorantkę i techniki analizy statystycznej są ogólnie przyjęte i w pełni poprawne. Metody statystyczne zastosowane w pracy są starannie dobrane i adekwatne zarówno do założeń jak i obranych technik.

Wyniki badań Autorka przedstawiła w dwóch dołączonych pracach oryginalnych. Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła w postaci opisowej oraz zilustrowała je czterema rycinami i trzema tabelami. Zwraca uwagę staranność i przejrzystość opracowania. Wyniki badań są bardzo ciekawe. Doktorantka zauważyła, m. in. że:

- eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125, CD193, CD62L i CD14 w porównaniu z eozynofilami w płwocinie indukowanej w grupie

chorych na POChP, astmę oraz w grupie kontrolnej, co sugeruje zmianę fenotypu eozynofiliów po rekrutacji do dróg oddechowych niezależnie od rozpoznania;

- eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125+, CD193+, CD62L i CD14+ w porównaniu z eozynofilami w płwocinie we wszystkich badanych grupach. Ekspresja CD11b była zwiększona na eozynofilach płwociny indukowanej w porównaniu do eozynofiliów we krwi ale tylko w grupie chorych na astmę; ekspresja CD66b była taka sama na eozynofilach krążących i w drogach oddechowych;
- zwiększony odsetek eozynofiliów CD193+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną, odsetek eozynofiliów CD66b+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną (67,9 [59,9–75,7]% vs. 39,1 [25,6–58,4]% oraz w astmie w porównaniu do grupy kontrolnej oraz obniżony poziom eozynofiliów CD11b+ w płwocinie w POChP w porównaniu z astmą;
- obniżony poziom eozynofiliów CD193-CD125+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną;
- różną polaryzację eozynofiliów tkankowych i ogólnoustrojowych oraz różnice w subpopulacjach eozynofiliów u chorych na POChP w porównaniu z astmą lub osobami zdrowymi;
- poziom IgE nie korelował ze stężeniem IL-5, eotaksyny-3 ani ekspresją CD193 w płwocinie i eozynofilach we krwi u pacjentów z astmą, POChP i grupą kontrolną;
- zwiększona ekspresja mRNA CCL3L1 w eozynofilach u chorych na POChP może sugerować, że rolą eozynofiliów w POChP jest przyciąganie makrofagów do płuc, a nie promowanie zapalenia eozynofilowego w drogach oddechowych; może to wskazywać na odmienną funkcję eozynofiliów w patobiologii astmy w porównaniu do POChP oraz może wyjaśniać różną wrażliwość na wGKS u pacjentów z POChP i astmą;

Autorka bardzo szczegółowo opisuje analizy statystyczne zgodnie z założonymi celami. Pragnę jednak podkreślić, iż wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę uważam za rzetelne,

bardzo ciekawe i istotne w przyszłych kierunkach badań.

Dyskusje zawarte w pracach, to dość istotne rozdziały pracy doktorskiej. Po przedstawieniu opublikowanych prac Autorka przedstawiła zwięzłe podsumowanie skupiające się przede wszystkim na własnych spostrzeżeniach wynikających z przeprowadzonych badań i wykazuje podobieństwa lub niespójności wyników i opinii badaczy zajmujących się podobnym do podjętego przez Niej problemem. Bardzo ciekawa jest analiza szlaków REACTOME. Doktorantka wykazała, że dla genów o obniżonej ekspresji w POChP jest nadreprezentacja szlaku związanego z IL-4 i IL-13. IL-4 i IL-13, obok IL-5 – kluczowe cytokiny w zapaleniu typu 2 (Th2). Powyższe wyniki potwierdziły, że zapalenie Th2 jest ważnym szlakiem w patofizjologii astmy, a w mniejszym stopniu w POChP.

Bardzo ciekawe spostrzeżenia Doktorantki dotyczyły eozynofili CD193+ i CD66b+ w płwocinie indukowanej. We wszystkich trzech grupach eozynofile we krwi i płwocinie charakteryzowały się przewagą profilu CD193+CD125+. Stwierdzono obniżony poziom eozynofili CD193-CD125+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki badania Doktorantki sugerują różną polaryzację eozynofili tkankowych i ogólnoustrojowych oraz różnice w subpopulacjach eozynofili u chorych na POChP w porównaniu z chorymi na astmę lub osobami zdrowymi. Interesujące jest, Kandydatka nie stwierdziła 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 stwierdziła korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofili CD125+CD193+. Niezwykle interesujące są badania 26 genów we krwi obwodowej u chorych na POChP i astmę. Geny, których ekspresja była najsilniej zwiększona w POChP – CCL3L1 i CCL4L2 kodowały chemokiny. Gen CCL3L1 koduje białko zapalne makrofagów 1 α (MIP-1 α). Wiązanie MIP-1 α – CCR5 bierze udział w procesach związanych z uszkodzeniem połączeń ścisłych w nabłonku dróg oddechowych w POChP. CCR5 jest także receptorem dla MIP-1 β kodowanym m.in. przez CCL4L2, którego ekspresja w naszym badaniu okazała się zwiększona u pacjentów z POChP. Zarówno MIP-1 α , jak i MIP-1 β są chemoatraktantami monocytów i makrofagów. Stwierdzona przez Doktorantkę zwiększona ekspresja mRNA CCL3L1 w eozynofilach u chorych na POChP może sugerować, że rolą eozynofili w POChP jest przyciąganie makrofagów do płuc, a nie promowanie zapalenia

eozynofilowego w drogach oddechowych. Może to wskazywać na odmienną funkcję eozynofilów w patobiologii astmy i POChP oraz może wyjaśniać różną wrażliwość na wGKS u pacjentów z POChP lub astmą.

Autorka dyskutuje w sposób umiemy i ciekawy z doniesieniami innych badaczy. Należy podkreślić pełną dojrzałość Autorki do formułowania wywodów naukowych, w sposób bardzo logiczny i krytyczny.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań Doktorantka zawarła w 6-u punktach:

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

zbadanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofiliów CD125+CD193+;

6. Analiza mRNA eozynofiliów we krwi obwodowej pozwoliła zidentyfikować różnice w profilu transkrypcyjnym pomiędzy POChP a astmą, co może sugerować odmienną funkcję biologiczną eozynofiliów w obu jednostkach chorobowych;

Wracając do meritum tej części dysertacji, stwierdzam poprawność logiczną i redakcyjną wszystkich wniosków zaprezentowanych w pracy.

Dla porządku dodam, że piśmiennictwo liczy 103 pozycje (nie licząc zawartych w dołączonych publikacjach będących podstawą rozprawy) i w zdecydowanej większości pochodzi z kilku ostatnich lat. Załączony wykaz skrótów i publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej stanowczo ułatwia czytanie pracy. Streszczenie liczy 3 strony, jest rzeczowe i merytoryczne, co również ułatwia zapoznanie się z problemem.

Moje podsumowanie dysertacji, którą miałem przyjemność recenzować, jest jednoznaczne. Temat pracy, niezwykle aktualny i pożyteczny z punktu problemów diagnostyczno/terapeutycznych POChP, choroby sprawiającej dużo problemów terapeutycznych, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono bardzo starannie, z wykorzystaniem prawidłowego warsztatu badawczego. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą, którą poparła własnym doświadczeniem a także aktualnym piśmiennictwem, trafnie wykorzystanym we wstępie, metodyce i dyskusji.

Równie jednoznaczny jest mój wniosek końcowy: praca pt. „Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofiliów we krwi i drogach oddechowych u chorych na POChP” autorstwa lek. lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej awykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Górskiej spełnia wszystkie kryteria przewidziane odpowiednią ustawą wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym składam na ręce Przewodniczącego Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Prof dr hab. n. med. Wojciech Naumnik