Wojskowy Instytut Medycyny Lotniczej

Warszawa, 02.06.2018 roku

dr hab. n. med. Andrzej Wojdas, prof. nadzw. WIML
Klinika Otolaryngologii
ul. Krasińskiego 54, 01-755 Warszawa
tel.: 261 852 341
e-mail: awojdas@wiml.waw.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Ewy Polkowskiej
pt.: „Dynamika zmian ilościowych wybranych subpopulacji limfocytów T u pacjentów poddanych immunoterapii swoistej"

Niedawno minęło 100 lat od ustalenia podstawowych reguł stosowania immunoterapii alergenowej (AIT – allergen immunotherapy). Uważa się, że stanowi ona jedyne postępowanie profilaktyczno-terapeutyczne, skuteczne w wielu przypadkach alergii.

Immunoterapia alergenowa może trwale wpłynąć na stan kliniczny pacjenta i złagodzić przebieg alergii, a nawet doprowadzić do pełnego wyleczenia. Jest to o tyle ciekawe, że według ustalonych definicji nie jest to leczenie objawowe, ale również nie mieści się w pojęciu klasycznego leczenia przyczynowego. Za efekt terapeutyczny odpowiedzialne są zmiany funkcji układu odpornościowego przebiegające w długim czasie.

Celem AIT jest wytworzenie przetrwałej tolerancji na specyficzny alergen. Ta forma terapii oddziałuje na swoistą odpowiedź immunologiczną i zmienia jej funkcjonowanie. Jest to proces złożony, składający się z wielu mechanizmów:

modulacja funkcji limfocytów T, wpływ na reaktywność komórek i narządów efektorowych oraz wpływ na syntezę immunoglobulin.

Obecnie uznaje się, że kluczem do sukcesu tej formy leczenia jest indukowanie alergenowo-swoistych limfocytów o funkcji regulatorowej (supresyjnej). Funkcje regulatorowe pełnią przede wszystkim limfocyty T i określa się je zbiorczo jako regulatorowymi limfocytami T CD4+ CD25+ lub w skrócie Treg. Podstawową charakterystyką komórek Treg jest identyfikacja czynnika transkrypcyjnego FOXP3, który jest obecnie uznawany za najbardziej specyficzny marker komórek Treg.

Wśród Limfocytów Treg wyróżnia się tak zwane naturalne limfocyty regulatorowe (nTreg) i indukowane limfocyty regulatorowe (iTreg), określone czasami adaptywnymi limfocytami regulatorowymi (aTreg). Jest to niewielka pula komórek T CD4+ przekształcająca się z dojrzałych limfocytów T w komórki Treg w trakcie odpowiedzi pod wpływem kooperacji z komórkami prezentującymi antygen (APC) w obwodowych narządach limfatycznych.

Limfocyty Treg zawierają dwie główne subpopulacje: limfocyty Th3 i Tr1. Obie rozwijają się z limfocytów Th0, a efekt supresyjny w ich przypadku wynika z wytwarzanych cytokin – oddziałują hamująco na różne populacje limfocytów B i T, komórki NK, ale także na inne komórki, na przykład prezentujące antygen. Limfocyty Th3 powstają w warunkach dużego stężenia w mikrośrodowisku transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β) i podobnie jak nTreg ich markerem jest FOXP3. Gdy są w pełni dojrzałe, wydzielają duże ilości TGF-β.

Limfocyty regulatorowe Tr1 są komórkami z reguły FOXP3-, sprzyjająco na ich rozwój działa przede wszystkim IL-27, a za ich supresyjne oddziaływanie odpowiedzialna jest wytwarzana przez nie w dużych ilościach IL-10. Wewnątrzkomórkowym znacznikiem funkcjonalnym tej populacji jest AHR (arylhydrocarbon receptor).

Coraz powszechniej akceptowana jest hipoteza, że jednym z ważniejszych zjawisk immunologicznych, gwarantujących trwałość terapeutyczną immunoterapii alergenowej jest indukcja limfocytów regulatorowych, przede wszystkim Tr1, ale także limfocytów T CD4+CD25+FOXP3+ i odtworzenie stanu tolerancji na alergen, analogicznie jak u osób zdrowych.

Z uwagą przeczytałem więc pracę doktorską mgr Ewy Polkowskiej, która dotyczy ustalenia dynamiki zmian ilościowych subpopulacji limfocytów T u chorych poddanych swoistej immunoterapii alergenowej z powodu uczulenia na pyłki traw.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 115 stron maszynopisu. Zawiera 11 ponumerowanych tabel, 11 ponumerowanych rycin i 210 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy typowy. Praca została podzielona na trzynaście części. Wykaz zamieszczonych na początku pracy używanych skrótów oraz na końcu pracy spis tabel i rycin ułatwiają śledzenie treści pracy.

Rozprawa rozpoczyna się obszernym wstępem stanowiącym dobre wprowadzenie do tematu badań. Doktorantka skupia się w tej części pracy na dwóch tematach. Pierwszy dotyczy definicji, obowiązujących klasyfikacji, epidemiologii i zasad leczenia nieżytów nosa i alergicznego nieżytu nosa. Informacje w nich zawarte są rezultatem wytycznych raportu ARIA, badań ECRHS i ACAP. W drugim omawia odpowiedź immunologiczną i opisuje rolę limfocytów T regulatorowych w reakcji alergicznej.

Kolejna część dyseratacji to „Cel pracy". Autorka podjęła się ocenić rolę komórek T regulatorowych w indukcji tolerancji alergenowej u pacjentów chorujących na okresowy alergiczny nieżyt nosa, uczulonych na alergeny pyłków traw, poddanych swoistej immunoterapii alergenowej.

W rozdziale „Materiał i metody" doktorantka charakteryzuje 90-osobową grupę badanych chorych i 30-osobową grupę kontrolną oraz określa zastosowane metody badawcze. Ustalono bardzo precyzyjnie kryteria włączenia do badania i wyłączenia z badania, do których nie mam zastrzeżeń.

Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem programu STATISTICA 10.0. Różnice pomiędzy wartościami średnimi dla poszczególnych grup oceniano testem U-Mann'a - Whitney'a przyjmując różnicę na poziomie $p<0,05$ jako znamienną statystycznie. Wzorowy dobór metod statystycznych pozwolił Autorce na maksymalne wykorzystanie otrzymanych wyników badań i świadczy o rzetelnej wiedzy Doktorantki oraz dowodzi odpowiedniej opieki Promotora.

Zasadniczą i najbardziej obszerną częścią pracy stanowią dwa rozdziały „Wyniki" i „Omówienie wyników". Są one opisane i zaprezentowane w sposób czytelny i przejrzysty z wykorzystaniem 9 tabel i 11 rycin.

Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że w okresie nasilonej ekspozycji alergenowej wzrasta znamiennie średnia wartość stężeń IgE całkowitej i alergenowo-swoistej w odniesieniu do okresu braku ekspozycji alergenowej we wszystkich ocenianych grup.

Występują też znamienne statystycznie różnice w badanych grupach średnich wartości odsetkowych we krwi obwodowej limfocytów CD19+, limfocytów CD3+, limfocytów CD4+; limfocytów CD8+ i komórek NK.

Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD3+ z cytoplazmatyczną koekspresją IFN-γ we wszystkich grupach była znamiennie wyższa w okresie braku ekspozycji na alergen.

Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD3+ z cytoplazmatyczną koekspresją IL-4 w okresie braku ekspozycji na alergen, w grupie pacjentów poddanych immunoterapii z efektem dobrym była znamiennie niższa w stosunku do grup pacjentów leczonych ze złym efektem i nie poddanych swoistej immunoretapii alergenowej. Natomiast w ocenie letniej, w grupie pacjentów leczonych ze złym efektem była znamiennie wyższa od grup pacjentów leczonych z dobrym efektem i nie odczulanych.

Znamiennie wyższe były wartości proporcji limfocytów CD3+IFN-γ+ wobec CD3+IL-4+ stwierdzono w grupie pacjentów odczulanych z efektem dobrym do grupy pacjentów odczulanych ze złym efektem terapeutycznym w okresie letnim i zimowym.

Znamiennie wyższe były wartości proporcji limfocytów CD8+ z cytoplazmatyczną koekspresją IFN-γ stwierdzono w grupie pacjentów odczulanych z efektem dobrym do grupy pacjentów odczulanych ze złym efektem zarówno w okresie zimowym i letnim.

Średnie wartości odsetkowe limfocytów CD8+ z cytoplazmatyczną koekspresją IL-4 w okresie letnim i zimowym, w grupie pacjentów poddanych immunoterapii z efektem dobrym była znamiennie niższa od grup pacjentów leczonych ze złym efektem i nie poddanych swoistej immunoretapii alergenowej.

Znamiennie wyższe były wartości proporcji limfocytów CD8+IFN-γ+ wobec CD8+IL-4+ stwierdzono w grupie pacjentów odczulanych z efektem dobrym do pozostałych grup pacjentów w obu okresach, a w grupie z dobrym efektem terapeutycznym znamiennie wyższe w okresie letnim.

Równie ciekawe wyniki uzyskano w ocenach wartości odsetkowych limfocytów Treg. Po trzyletniej immunoterapii poziom limfocytów Treg w obu grupach zima był znacznie niższy niż latem, a w grupie z dobrym efektem terapeutycznym wyższe latem niż zimą.

Następny rozdział to „Omówienie". Dyskusja jest interesująca i wartościowa, na wysokim poziomie merytorycznym. Doktorantka wyczerpująco, z dojrzałością naukową i umiejętnie analizuje wyniki swoich obserwacji na tle badań innych autorów. Na szesnastu stronach autorka omówiła aktualny stan wiedzy dotyczący odpowiedzi immunologicznej na alergenową immunoterapię swoistą, następnie omówiła grupy badanych pacjentów i uzasadniła retrospektywny podział chorych w zależności od efektów leczenia określony na podstawie współczynnika T5SS. Na kolejnych stronach rozdziału autorka omówiła wyniki poziomu całkowitego IgE, swoistych IgE, wartości odsetkowych różnych subpopulacji limfocytów T (CD3+; CD4+; CD8+), limfocytów B (CD19+) i komórek NK (CD16+CD56+) w obu grupach pacjentów odczulanych; Wszystkie elementy dyskusji stanowią oryginalne ujęcie wyników i porównanie z danymi niezwykle bogatego piśmiennictwa. To część rozprawy doktorskiej pokazuje dojrzałość doktorantki w prezentowaniu swoich wyników badań i umiejętność wyszukania pozycji piśmiennictwa, które zostało użyte dla skomentowania własnych wyników. Zgadzam się z autorką, że o powodzeniu immunoterapii alergenowej decydują nie tyle wartości średnich stężeń limfocytów oceniane w sezonie nasilonej ekspozycji alergenowej, co ich stabilność manifestująca się brakiem znamiennych różnic pomiędzy ocena letnia i zimową.

Kolejna część dysertacji to sześć wniosków. Są one postawione prawidłowo. Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie z pracy zaproponowanych wniosków.

Kolejna część rozprawy doktorskiej to „Piśmiennictwo". Zawiera ono 210 pozycji, Jest dobrze dobrane i w pracy wykorzystane.

Streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera podstawowe wiadomości dotyczące dysertacji. Wiadomości zostały przedstawione w sposób zwięzły. Zwrócono uwagę czytelnika na najważniejsze elementy i wyniki pracy. Jest napisane poprawnie.

Kolejne części to spis rycin i tabel bez komentarza.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę, że w tytule pracy termin „...immunoterapii swoistej" zamieniłbym na „...swoistej immunoterapii alergenowej". Tytuł jest czytelny, ale mam wrażenie, że to drugie wyrażenie brzmi bardziej jednoznacznie.

Dodam tylko, że moja uwaga nie umniejsza wartości pracy.

Pragnę zaznaczyć, że rozprawa doktorska mgr Ewy Polkowskiej pt.: „Dynamika zmian ilościowych wybranych subpopulacji limfocytów T u pacjentów poddanych

immunoterapii swoistej" spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) stawiane rozprawom na stopień w zakresie doktora nauk medycznych.

Z satysfakcją zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Ewy Polkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie pragnąc wyrazić swoje uznanie dla ważkości podjętego tematu pracy, reprezentatywnej grupy badawczej i rzetelności warsztatu wnoszę o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku

KIEROWNIK
KLINIKI OTOLARYNGOLOGII
Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej
płk rez. dr hab. n. med. Andrzej WOJDAS
prof. WIML