dr hab. n.med. Jarosław Baran, Prof. UJ
Zakład Immunologii Klinicznej,
Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Doroty Dąbrowskiej-Zagroby pt. „Wpływ flawonoidów oraz witaminy C na formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) u chorych na miażdżycę”.

Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. n.med. Ewy Jabłońskiej
(promotor pomocniczy Dr n.med. Marzena Garley)
w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Miażdżyca jest przewlekłą ogólnoustrojową chorobą zapalną tętnic, zapoczątkowaną uszkodzeniem śródbłonka. Cechą charakterystyczną miażdżycy jest tworzenie się bogatolipidowych blaszek miażdżycowych w obrębie warstwy wewnętrznej ściany tętnic. Zaawansowane zmiany miażdżycowe upośledzają ukrwienie tkanek i narządów przez zmniejszenie światła naczyń oraz wykrzepienie w wyniku pęknięcia blaszki miażdżycowej, co może mieć miejsce w każdym stadium jej rozwoju. Choroba ta, wraz z jej powikłaniami, stanowi jeden z najistotniejszych problemów współczesnej medycyny, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych, gdzie jest główną przyczyną zgonów oraz inwalidztwa wśród osób dorosłych

Na tym tle, w przedstawionej rozprawie doktorskiej mgr Dorota Dąbrowska-Zagroba podjęła się oceny *in vitro* wpływu witaminy C oraz flawonoidów na tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) u pacjentów z miażdżycą. Wybór takiej tematyki badawczej był jak najbardziej uzasadniony, bowiem mechanizmy odporności wrodzonej, obejmujące również aktywność neutrofilów i tworzenie NETs, jak się obecnie uważa, obok złogów cholesterolu i nadciśnienia, leżą u podstaw uszkodzenia śródbłonka i powstawania zmian miażdżycowych, a stosowanie związków o charakterze antyoksydacyjnym może przeciwdziałać rozwojowi reakcji zapalnej.

Rozprawa posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Poprzedzają ją wykaz najczęściej używanych skrótów i symboli oraz wykaz rycin i tabel.

W obszernym wstępie autorka wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od charakterystyki neutrofilów i opisu ich funkcji w organizmie człowieka (ze szczególnym uwzględnieniem procesu netozy), poprzez opis miażdżycy - jej patomechanizmu i roli komórek układu odpornościowego w powstawaniu zmian miażdżycowych, po szczegółową charakterystykę zastosowanych w badaniach antyoksydantów – witaminy C i wybranych flawonoidów. Doktorantka kolejno przedstawiła zagadnienia i pojęcia, których poznanie jest niezbędne dla zrozumienia zasadności podjęcia

tematu badawczego i koncepcji pracy. Cały ten rozdział posiada ogólnie edukacyjny charakter, dodatkowo poparty czytelnymi schematami i tabelami.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka drobnych mankamentów, głównie natury semantycznej, dostrzeżonych w tej części rozprawy. I tak, autorka definiując odpowiedź immunologiczną używa pojęć „odpowiedź nieswoista" i „odpowiedź swoista". Te określenia, choć jeszcze funkcjonujące, nie są jednak właściwe. Obecnie uważa się, iż również mechanizmy dawniej zaliczane do „odporności nieswoistej" wykorzystują w interakcji gospodarz-patogen swoiste oddziaływania „ligand-receptor" i bardziej adekwatne jest używanie pojęcia „odpowiedź wrodzona" i odpowiednio, „odpowiedź nabyta". Z kolei, w rozdziale poświęconym sieciom neutrofilowym (str. 21), autorka pisze, odnosząc się do pojęcia „netozy", iż jest to „unikalna forma śmierci neutrofilów", podczas gdy w rzeczywistości proces formowania sieci neutrofilowych nie zawsze prowadzi do śmierci komórki, o czym zresztą pisze sama doktorantka nieco dalej (str. 25). Uwagi te mają jednak charakter czysto porządkujący i nie wpływają na ogólnie wysoką wartość merytoryczną tej części rozprawy.

Pewien niedosyt pozostawia natomiast brak w tej części pracy bardziej szczegółowych danych dotyczących udziału monocytów, a zwłaszcza ich subpopulacji w patomechanizmie zmian miażdżycowych. W tym aspekcie, również rola limfocytów T została dość powierzchownie przedstawiona.

Cele pracy zostały jasno sformułowane i są adekwatne do głównego problemu postawionego w rozprawie. Drobna uwaga do tej części dotyczy opisu „Założeń rozprawy", które, moim zdaniem, powinny zostać skrócone – kolejne streszczanie zaburza bowiem ciągłość tekstu. Paragraf ten zawiera również pewne nie do końca poprawne określenia, tj. „proces immunologiczno-zapalny" - użyte do opisu miażdżycy czy „komórki immunokompetentne" - w odniesieniu do neutrofilów. W przypadku tego pierwszego, każdy proces zapalny jest jednocześnie immunologicznym, gdyż biorą w nim udział mechanizmy układu odpornościowego. W przypadku tego drugiego pojęcia, odnosi się ono wyłącznie do komórek mających zdolność do swoistego rozpoznania antygenu i reakcji z nim, a więc jest ograniczone do limfocytów B i T. Z mojej strony jest to jednak tylko sprostowanie niezręczności językowych, jakie przytrafiły się doktorantce.

Kolejna część pracy to „Materiał i metody". Rozdział ten otwiera zgoda lokalnej Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie przedmiotowych badań. Kolejno, doktorantka przedstawiła odpowiednio dobrane pod względem liczebnościowym, płci i wieku grupy pacjentów z miażdżycą i osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną oraz opisała wykorzystane procedury laboratoryjne. Uwagę zwraca szeroki zakres zastosowanych tu metod, obejmujących zarówno standardowe, jak i wysoce specjalistyczne techniki badawcze, np. wizualizację NETs w systemie mikroskopowym In Cell Analyzer 2200.

W opinii recenzenta, niektóre aspekty przedstawionych metod badawczych wymagają jednak dodatkowych wyjaśnień i uzupełnień. I tak, dla zrozumienia strategii badawczej istotne jest wyjaśnienie dlaczego po rozdziale leukocytów krwi w gradiencie gęstości z użyciem odczynnika Polymorphprep, doktorantka dodatkowo izolowała neutrofile metodą sortowania magnetycznego z przeciwciałami anty-CD16, skoro sam rozdział leukocytów w zastosowanym gradiencie gęstości pozwalał na uzyskanie frakcji komórek wielojądrzastych, w których obecność innych, niż neutrofile, granulocytów była niewielka (ok. 5% - dane szacunkowe recenzenta uzyskane w oparciu o analizę wyników rozkładu populacji

leukocytów pacjentów i zdrowych dawców przedstawionych w Tabeli 9) i zapewne byłaby mało istotna dla dalszych badań. Wyjaśnienie tego aspektu jest ważne, ponieważ zastosowane sortowanie magnetyczne mogło aktywować neutrofile za pośrednictwem przeciwciał anty-CD16 i wpłynąć na ich zdolność do tworzenia NETs w kolejnych etapach badań. Wyjaśnienia wymaga również dobór stężeń zastosowanych flawonoidów i witaminy C – ponieważ w badaniach użyto tylko pojedynczych stężeń antyoksydantów, nie jest jasne czy stężenia te zostały zaczerpnięte z danych literaturowych, czy zostały może wybrane na podstawie wcześniejszych badań pilotażowych, jako najbardziej efektywne. Mało dokładny jest również opis przeciwciał zastosowanych do oceny ekspresji białek techniką Western blot, nie jest bowiem jasne czy były to przeciwciała mono- czy poliklonalne i jakie było ich pochodzenie (mysie, królicze, szczurze?). Bliższych danych, co do rodzaju zastosowanych testów i przyjętych przedziałów ufności należałoby oczekiwać w opisie analizy statystycznej, który poza informacją o wykorzystaniu pakietu Statistica, nie zawiera żadnych szczegółów.

Opisując stosowane metody doktorantka nie ustrzegła się tu również drobnych błędów merytorycznych. I tak, przy oznaczaniu stężenia wolnego DNA w surowicy krwi i supernatantach z hodowli neutrofilów błędnie podała użycie metody immunoenzymatycznej ELISA, podczas gdy oznaczenie to przeprowadza się metodą fluorymetryczną. Błędne jest również podanie jako „ludzkie", pochodzenia przeciwciał anty-MPO znakowanych fluorescencyjnie. Są to wszystko drobne, acz istotne usterki, zwłaszcza z punktu widzenia potencjalnego badacza próbującego skorzystać z opisanej metodyki.

Kolejny rozdział – „Wyniki", to najobszerniejsza część pracy. Tę część doktorantka rozpoczyna od oceny leukocytozy i rozmazów krwi obwodowej w grupach pacjentów i zdrowych dawców, a uzyskane wyniki zestawiła w tabeli (Tabela 9). Wprawdzie, doktorantka nie stwierdziła istotnych różnic w badanych parametrach pomiędzy grupami pacjentów i zdrowych dawców, wskazane byłoby jednak przedstawienie w tabeli również wartości odchylenia standardowego (SD) lub standardowego błędu (SE) dla tych danych, w celu wizualizacji wielkości rozrzutu uzyskanych wyników. Ta sama uwaga odnosi się również do Tabeli 10, w której autorka przedstawiła tylko wartości średnie wyników analiz biochemicznych dla grupy pacjentów z miażdżycą. Szkoda, iż podobnego zestawienia nie przedstawiono również dla grupy zdrowych dawców. Mogę się tylko domyślać, iż w przypadku pacjentów wyniki te pochodziły zapewne z rutynowych badań zleconych w poradni, a w przypadku dawców krwi, badań takich w ogóle się nie wykonuje.

W kolejnej części tego rozdziału, doktorantka w sposób jasny i przekonujący przedstawia wyniki analizy poziomu neutrofilów tworzących NETs u pacjentów i osób zdrowych po stymulacji LPS i w obecności antyoksydantów, z wykorzystaniem systemu mikroskopowego In Cell Analyzer 2200 (Tabela 11). Dane te dodatkowo poparte zostały kolorowymi zdjęciami z wybranych obrazów mikroskopowych (Rycina 10). Uzyskane wyniki świadczą, iż u osób z miażdżycą spontanicznie więcej neutrofilów tworzy NETs niż u osób zdrowych. Co więcej, w obu grupach preinkubacja neutrofilów ze związkami o charakterze antyoksydantów z grupy flawonoidów (kwercetyna, luteolina), istotnie wpływała na obniżenie odsetka komórek tworzących sieci po stymulacji LPS. W moim odczuciu jest to najistotniejsza część rozprawy, potwierdzająca słuszność podjętych badań. W tym miejscu można polemizować, czy dla pełniejszego obrazu nie byłoby wskazane aby wyniki te, dotyczące liczby (odsetka) komórek tworzących NETs, zestawić w tych samych grupach eksperymentalnych z poziomem uwolnionego do supernatantów DNA (oznaczonego metodą fluorymetrii), analogicznie jak zostało to zrobione w odniesieniu do supernatantów z hodowli

neutrofilów i surowicy krwi (Rycina 15). Takie zestawienie pozwoliłoby na ocenę wpływu badanych antyoksydantów zarówno na liczbę komórek produkujących NETs, jak również na ilości uwalnianych sieci. Samo badanie mikroskopowe takiej informacji niestety nie daje.

Interesujące są również wyniki analizy odsetka neutrofilów tworzących NETs u osób zdrowych w zależności od płci. Przedstawione na Rycinie 11 dane wskazują, iż po stymulacji LPS, istotnie więcej neutrofilów izolowanych od zdrowych kobiet tworzy NETs w porównaniu do komórek izolowanych od zdrowych mężczyzn. W zestawieniu tym zastanawia mnie brak istotnych różnic w odsetku komórek produkujących NETs pomiędzy grupami kobiet i mężczyzn, których neutrofile przed aktywacją LPS preinkubowano z kwercetyną lub luteoliną, w stosunku do analogicznych grup bez preinkubacji z tymi antyoksydantami (sama aktywacja LPS). Zgrubna analiza wizualna wskazywałaby na występowanie takich różnic, tym bardziej, iż zostały one stwierdzone w odniesieniu do całej populacji kontrolnej, bez podziału względem płci. Szkoda, iż podobnego zestawienia doktorantka nie dokonała w odniesieniu do pacjentów z miażdżycą, by sprawdzić czy trend ten obserwowany jest również u chorych. Ten niewątpliwie ciekawy aspekt wymaga dalszych, pogłębionych badań celem zweryfikowania potencjalnie zależnego od płci tworzenia NETs w trakcie aktywacji neutrofilów, np. w wyniku infekcji bakteryjnych. Mam nadzieję, ze doktorantka będzie ten wątek kontynuować, bowiem wyniki takich badań z pewnością zaowocują dobrą publikacją z tego tematu.

W kolejnych podrozdziałach doktorantka dokonała wszechstronnej oceny wybuchu tlenowego neutrofilów, analizując wpływ antyoksydantów na różne etapy tego procesu po aktywacji LPS, łącznie z badaniem ekspresji poszczególnych podjednostek oksydazy NADPH, zarówno u pacjentów, jak i zdrowych dawców. Z kolei, w supernatantach z hodowli i surowicach krwi przeanalizowała poziomy wolnego DNA i MPO, korelując je ze sobą. Uzyskane wyniki zostały poprawnie zinterpretowane, choć w odniesieniu do Rycin 12-21 niezbędna jest informacja o metodach statystycznych użytych do porównania badanych grup, gdyż wizualna ocena przedstawionych danych, z uwzględnieniem stopnia ich rozrzutu, nie pozwala na stwierdzenie istotnych różnic.

Kolejny rozdział - „Dyskusja", zasługuje na uznanie. W tej części rozprawy doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością przedmiotu i wnikliwie ustosunkowała się do uzyskanych wyników w kontekście literatury światowej. W tym miejscu pragnę podkreślić, iż mgr Dąbrowska-Zagroba jest wiodącym autorem trzech artykułów poglądowych z tego tematu, opublikowanych w prestiżowych czasopismach. Nie zdarza się to często na tym etapie drogi naukowej i jest przejawem dużego zaangażowania i aktywności doktorantki na tym polu.

W dyskusji autorka podkreśla, iż związek pomiędzy NETs a zmianami miażdżycowymi został w literaturze dobrze udokumentowany, m.in. na podstawie badań blaszek miażdżycowych po zabiegu endarterektomii. W oparciu o dane literaturowe doktorantka wskazuje na istotną rolę złogów cholesterolu w aktywacji procesu netozy, przytacza potencjalne mechanizmy prowadzące do inicjacji procesu zapalnego w ścianie tętnic w wyniku uwalniania NETs, podkreśla również rolę cytokin prozapalnych w rozwoju blaszki miażdżycowej. Bardzo trafnie interpretuje pozorną sprzeczność we własnych wynikach badań dotyczących poziomu wolnokrążącego DNA i MPO w surowicy krwi pacjentów z miażdżycą, a ich poziomem obserwowanym *in vitro* w supernatantach z hodowli neutrofilów. Odnosi się również do braku różnic w wynikach testu redukcji NBT między komórkami pacjentów i zdrowych dawców po stymulacji cząstkami lateksu, choć neutrofile

chorych na miażdżycę po stymulacji LPS wykazywały zwiększoną ekspresję podjednostek oksydazy NADPH, co należałoby wiązać ze zwiększoną jej aktywnością. W tym miejscu można dywagować, czy gdyby do obu testów użyto tych samych stymulatorów lub zamiast mało czułego i mało specyficznego testu redukcji NBT, doktorantka zdecydowałaby się na użycie bardziej czułego i obiektywnego testu cytometrycznego z DHR123, wyniki tych badań nie korelowałyby ze sobą. Pozostawiam to do rozważenia przy ewentualnej kontynuacji badań. W podsumowaniu dyskusji autorka wskazuje na realną możliwość hamowania tworzenia NETs przez związki o charakterze antyoksydacyjnym również w warunkach *in vivo,* przeciwdziałając w ten sposób rozwojowi miażdżycy. Podjęcie takich badań byłoby logiczną kontynuacją tego opracowania. Rozdział ten kończy bardzo czytelny schemat przedstawiający rolę neutrofilów w powstawaniu zmian miażdżycowych i potencjalny przeciw-miażdżycowy wpływ badanych antyoksydantów.

„Wnioski" zwięźle rekapitulują uzyskane w poszczególnych etapach wyniki badań, choć w moim odczuciu właściwsze byłoby ich umieszczenie bezpośrednio po „Wynikach", gdzie stanowiłyby logiczną ciągłość tekstu. Całość rozprawy zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury, obejmujący 238 pozycji, w tym również szereg najnowszych.

Na zakończenie swojej recenzji pragnę podkreślić, iż przedłożone opracowanie jest interesujące, tak z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia. Przedstawione wyniki z jednej strony potwierdzają dane literaturowe, dotyczące związku NETs z rozwojem miażdżycy, a z drugiej dostarczają wartościowych i nowych obserwacji dotyczących wpływu flawonoidów i witaminy C na proces tworzenia NETs *in vitro* u chorych z miażdżycą. Właściwe ich zestawienie z pewnością przyniesie autorce kolejne publikacje, a ewentualna kontynuacja badań w warunkach *in vivo* u pacjentów czy u osób z grupy ryzyka (nadciśnienie, hipercholesterolemia) w formie suplementacji, może przyczynić się do rozwoju leczenia wspomagającego lub zapobiegającego/opóźniającego rozwój choroby.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Doroty Dąbrowskiej-Zagroby spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. 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. 1 z dnia 3 lipca 2019r „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.)". Prezentuje ona wyniki oryginalnych badań i jest wartościowym wkładem w rozwój wiedzy na temat patomechanizmów miażdżycy i możliwości przeciwdziałania jej rozwoju. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie mgr Doroty Dąbrowskiej-Zagroby do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina nauki medyczne.

Dr hab. n.med. Jarosław Baran, Prof.UJ

Kraków, 17.04.2020