Warszawa 27.04.2020

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Doroty Dąbrowskiej-Zagroba „Wpływ flawonoidów oraz witaminy C na formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) u chorych na miażdżycę."

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami poprzez proces fagocytozy, degranulacji ziarnistości oraz generacji wolnych rodników tlenowych i azotowych. Ostatnio opisano nowy mechanizm obronny granulocytów, zależny od tworzenia zewnątrzkomórkowych sieciopodobnych struktur złożonych ze zdekondensowanej chromatyny jądrowej oraz enzymów, nazwany *neutrophil extracellural traps (NETs)*. NET jest kluczowym elementem odporności nieswoistej, ale także źródłem antygenów i czynników prozapalnych, dlatego nieprawidłowości w tworzeniu lub degradacji tej struktury są powiązane ze wzrostem podatności organizmu na zakażenia i choroby zapalne, do których należy miażdżyca. Istnienie związku pomiędzy powikłaniami miażdżycy, takimi jak choroba wieńcowa czy udar niedokrwienny, a lokalnym tworzeniem sieci neutrofilowych jest powszechnie znane. Z tego powodu zahamowanie procesu prowadzącego do zamknięcia naczynia zmienionego miażdżycowo poprzez stosowanie nietoksycznych substancji miałoby istotne implikacje kliniczne. Wybór tematu pracy ma więc istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Starannie przygotowany maszynopis pracy liczy 118 stron, jest podzielony na 8 rozdziałów, opatrzony jest 28 czytelnymi rycinami, oraz 11 tabelami i zawiera zestawienie 238 pozycji piśmiennictwa.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań była porównanie grupy osób z miażdżycą i bez miażdżycy w zakresie nasilenia procesu tworzenia NETs i aktywności kompleksu oksydazy NADPH, wpływu flawonoidów (kwercetyny i luteoliny) oraz witaminy

C na proces formowania sieci *in vitro* przez neutrofile krwi obwodowej oraz ocena ekspresji białek kompleksu oksydazy NADPH i ocena generacji anionu ponadtlenkowego przez neutrofile w badanych grupach i modyfikacja tego procesu przez flawonoidy i witaminę C.

We wstępie Doktorantka przedstawiła informacje o rozwoju, budowie i funkcji granulocytów, opisując szczegółowo proces ich powstawania w szpiku kostnym, proces fagocytozy i degranulacji. Autorka przedstawiła budowę i funkcję sieci neutrofilowych oraz genezę ich tworzenia, z uwzględnieniem poznanych elementów mechanizmu molekularnego. W końcowej części wstępu opisana została patogeneza miażdżycy i zamieszczone zostały informacje o związkach flawonowych stosowanych w przedstawionej pracy doktorskiej. Wstęp dobrze uzasadniał genezę pracy doktorskiej.

Badania przeprowadzono w grupie 22 chorych z rozpoznaną miażdżycą w wieku średnio około 60 lat. Grupa kontrolna była w podobnym wieku, włączone do badania osoby nie miały miażdżycy. Istotnym problemem wydaję się fakt, iż nie przedstawiono kryteriów rozpoznania/wykluczenia miażdżycy. W opisie grupy badanej brakuje opisu parametrów służących do rozpoznania miażdżycy i wskazania parametru, na podstawie którego włączano chorych do każdej z porównywanych grup. Ponieważ średnia wieku grupy kontrolnej była również około 60 lat, nie jest możliwe aby te osoby nie posiadały żadnych zmian miażdżycowych. Miażdżyca jest chorobą dotyczącą w mniejszym lub większym stopniu wszystkich osób w starszym wieku. Stanowi kontinuum and nie jest zjawiskiem ocenianym w kategoriach tak/nie. Dlatego opis kryteriów włączenia do grupy badanej i grupy kontrolnej wydaje się być bardzo istotny. Istotne wydaje się również definiowanie, jakie kryteria musi spełniać pacjent włączany do każdej z badanych grup. Brak również informacji o innych chorobach współistniejących, które mogą wpływać na funkcje układu immunologicznego. Nie podano również informacji na temat leków mogących wpływać na funkcje granulocytów np. statyn ani informacji czy osoby z obu grup przyjmowały suplementy diety zawierające np. witaminę C, inne flawonoidy lub antyoksydanty. Generalnie kryteria włączenia i wyłączenia z badania nie zostały przedstawione.

W rozdziale „materiały i metody" wyczerpująco opisane zostały techniki laboratoryjne stosowane w pracy, metody izolacji granulocytów krwi obwodowej, przebieg procesu inkubacji komórek z badanymi substancjami oraz wizualizacji sieci, metody immunoenzymatyczne, cytometryczne, western blot i oceny wybuchu tlenowego (test NBT) oraz testu redukcji cytochromu c.

W pracy brakuje opisu metod stosowanych w analizie statystycznej.

Na podstawie eksperymentów badawczych Doktorantka stwierdziła, że spontaniczne oraz wyzwalane przez LPS tworzenie sieci neutrofilowych jest wyższe u chorych na miażdżycę. W grupie chorych oraz grupie kontrolnej flawonoidy hamowały tworzenie sieci po stymulacji LPS. Natomiast witamina C hamowała uwalnianie sieci po stymulacji tylko w grupie osób bez miażdżycy. Zabrakło wyjaśnienia w jaki sposób oceniono ilościowo wyrzut sieci czy odsetek komórek sieciujących. Zdjęcie obrazu mikroskopowego zamieszczonego w niniejszej pracy nie daje wskazówek w tym zakresie. Ogólnie w pracy ilościowo oceniono uwalnianie sieci za pomocą oceny uwalniania wolnego DNA do medium hodowlanego granulocytów. Jest to powszechnie przyjęta metoda, jednakże przedyskutowanie jej ograniczeń (uwalnianie DNA także z apoptotycznych czy nekrotycznych komórek) byłoby wartościowe. W grupie kontrolnej więcej komórek tworzących sieć zaobserwowano u kobiet niż u mężczyzn pod wpływem stymulacji LPS. Cytometryczna ocena wskazała na wyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję mieloperoksydazy u chorych na miażdżycę w porównaniu do osób zdrowych. Badane związki: flawonoidy i witamina C obniżały odsetek komórek MPO-dodatnich. Wartościowym uzupełnieniem pracy byłyby ryciny lub wykresy z cytometru przepływowego oraz opis markerów powierzchniowych neutrofilów stosowanych w badaniu. W supernatantach neutrofilów u chorych na miażdżycę nie zaobserwowano różnic pomiędzy stężeniem MPO u osób z miażdżycą i bez. Badane substancje hamowały uwalnianie MPO do supernatantu. Średnie stężenie MPO w surowicy wyższe u chorych na miażdżycę. Kolejno Doktorantka oceniła stężenie wolnokrążącego DNA w supernatantach krótkich hodowli neutrofilów niestymulowanych i po stymulacji LPS. Stężenie cfDNA było wyższe w grupie chorych z miażdżycą a stosowane antyoksydanty obniżały jego stężenie. W grupie chorych na miażdżycę zaobserwowano także wyższe stężenia anionorodnika ponadtlenkowego. Uwalnianie tego rodnika było hamowane przez antyoksydanty. Obserwowano również wyższą ekspresję podjednostek oksydazy NADPH u chorych na miażdżycę, hamowaną przez antyoksydanty. Stężenie cfDNA w supernatantach neutrofilów korelowało ze stężeniem MPO osób zdrowych, w miażdżycy znamiennej korelacji pomiędzy tymi parametrami nie zaobserwowano. Stężenie MPO w surowicy i supernatantach korelowało u zdrowych, natomiast u chorych na miażdżycę obserwowano korelację ujemną, co jest dosyć zaskakującą obserwacją w świetle współczesnej wiedzy o tworzeniu NETs i udziału MPO w strukturach sieci. Warto byłoby przedyskutować tę obserwację. Stężenia wolnego DNA i MPO korelowały w surowicy osób bez miażdżycy.

W zwięzłym rozdziale dyskusja Autorka ustosunkowała się do otrzymanych wyników w świetle doniesień innych autorów. Doktorantka podkreśliła udział NETs i MPO i cfDNA w

przebiegu miażdżycy. Przyczyny nadprodukcji sieci w miażdżycy Autorka upatruje w hipercholesterolemii. Podobne obserwacje odnotowano na modelu mysim, jednakże jednoznaczne wnioski można by było wyciągnąć dopiero po przeprowadzeniu badań u ludzi w warunkach *in vivo*. Liczne doniesienia wskazujące na istnienie istotnych zależności pomiędzy tworzeniem NETs a wystąpieniem powikłań miażdżycy pozwoliłyby na przeprowadzenie szerszej i bardziej pogłębionej dyskusji. Autorka również słusznie sugeruje, że w patogenezie miażdżycy mogą brać udział cytokiny prozapalne. Z tym wnioskiem koreluje obserwacja wzrostu ekspresji białek oksydazy NADPH po stymulacji LPSem. Nie można się jednak zgodzić z twierdzeniem, że infekcje bakteryjne mogą pogłębiać tworzenie zmian miażdżycowych. Takie twierdzenie nie zostało w żaden sposób udowodnione w niniejszej pracy.

Pracę kończą jednoznacznie sformułowane wnioski. Z niektórymi wnioskami jednak należy polemizować. Formowanie NETs a uwalnianie wolnego DNA nie jest tożsame i, przy braku innej metody służącej do oceny ilościowej uwalniania sieci np. kolokalizacji nici DNA i elastazy, należy zwrócić uwagę na przyczyny rozbieżności. Niezasadny jest również wniosek, że infekcje bakteryjne prowadzą do progresji miażdżycy. Podobnie, przeformułować należy wniosek czwarty, że badane antyoksydanty ograniczają postęp miażdżycy. Taki wniosek wymagałby długotrwale prowadzonych badań klinicznych i monitorowania postępu miażdżycy u pacjentów poddanych leczeniu. Ostrożniejszy kolejny wniosek wskazujący na wartość terapii wspomagającej antyoksydantami (szczególnie, jeżeli znajdą się w diecie) jest słuszny. Pozostałe wnioski są prawidłowo sformułowane i są konsekwencją analizy wyników uzyskanych przez Autorkę.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Niewątpliwie praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Autorka wykonała wiele pracochłonnych eksperymentów i dokonała ciekawych obserwacji. Praca jest dowodem pracowitości i umiejętności realizowania zadań naukowych. Przedstawiona do oceny praca doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia. Stwierdzam, że praca lek. med. Doroty Dąbrowskiej-Zagroba pt: „Wpływ flawonoidów oraz witaminy C na formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) u chorych na miażdżycę" odpowiada kryteriom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow