



# POLITECHNIKA OPOLSKA

## Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii



ul. Prószkowska 76, bud. 9/35  
45-758 Opole  
www.wwfif.po.opole.pl

tel.: +48 77 449 82 50  
e-mail: wwfif@po.opole.pl

Opole, dn. 29 czerwca 2022 r.

dr hab. n. med. Edyta Majorczyk, prof. ucz.  
Katedra Fizjoterapii

### OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Łącznej pt. „Rola czynników zapalnych w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów”

wykonanej pod opieką naukową prof. dra hab. n. med. Andrzeja Pawlika

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) to przewlekła choroba autoimmunizacyjna związana z procesem zapalnym w obrębie błony maziowej stawów, który prowadzi do stopniowej destrukcji tkanek stawowych i postępującej niepełnosprawności pacjentów. Co więcej, choroba ma charakter uogólniony, zatem u większości pacjentów rozwijają się objawy pozastawowe i powikłania układowe. Epidemiologia wskazuje, że RZS dotyka ok. 1% populacji światowej, 3-krotnie częściej kobiet niż mężczyzn. Mimo licznych badań, patomechanizm choroby nie jest w pełni wyjaśniony, przy czym postuluje się udział czynników związanych z mechanizmami odporności, a także genetycznych i środowiskowych. Z uwagi na powyższe, kluczowe pozostaje podejmowanie badań mających na celu identyfikację nowych markerów choroby (genetycznych, biochemicznych, odpornościowych), czy też wyjaśnienie mechanizmów rozwoju i podtrzymywania stanu zapalnego. Ich wyniki mogą przyczynić się do optymalizacji procesu diagnozowania, zwłaszcza we wczesnej, skąpoobjawowej, fazie choroby oraz ustalenia skutecznych metod leczenia RZS. Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w niniejsze potrzeby, a Doktorantka podjęła się ambitnego zadania ustalenie roli czynników zapalnych w rozwoju RZS. Po wstępnej selekcji, do dalszych analiz Doktorantka wybrała cząsteczkę adiponektyny (ADPN), argumentując to niejednoznaczną rolą ADPN w rozwoju stanu zapalnego i niejasny jej udział w patogenezie choroby.

Mgr Małgorzata Łączna przygotowała dysertację nt. „Rola czynników zapalnych w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów”. Tu nasuwa mi się jedynie drobna

sugestia, że tytuł/temat pracy nie powinien być aż tak szeroko określony, a precyzyjniej wskazywać na zakres badań. Niemniej jednak, całość pracy stanowi logiczne i spójne opracowanie, które wnosi oryginalne i kompleksowe podejście do badań nad czynnikami zapalnymi w patogenezie RZS.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Łącznej liczy 101 stron, zawiera czytelnie przygotowane 11 tabel i 16 rycin, które właściwie uzupełniają informacje tekstowe. Układ formalny pracy jest poprawny a jej struktura jest logiczna i przejrzysta. Zgodnie z typowym układem prac empirycznych, dysertacja zawiera charakterystyczne dla rozpraw doktorskich rozdziały tj. Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Poza nimi, w strukturze pracy znajdują się spisy (treści, tabel, rycin), wykazy (piśmiennictwa, skrótów) oraz streszczenia (w języku polskim i języku angielskim). Autorka przygotowała rozprawę w oparciu o imponującą liczbę 177 pozycji piśmiennictwa – w znakomitej większości są to artykuły opublikowane w międzynarodowych czasopismach w ciągu ostatnich 15 lat. Wykorzystane pozycje zostały poprawnie dobrane i stanowią aktualny przegląd prac związanych z tematyką dysertacji.

Wstęp pracy stanowi obszerne i kompetentne omówienie istoty reumatoidalnego zapalenia stawów. Autorka przedstawiła etiopatogenezę choroby, w tym poszczególne czynniki ryzyka, epidemiologię, objawy kliniczne oraz diagnozowanie i leczenie RZS. Wstęp pracy wprowadza czytelnika w skomplikowaną materię zaburzeń prowadzących do rozwoju RZS. Wyróżnia go wysoka jakość doboru i przedstawienia treści, co podkreśla właściwe przygotowanie i stosowne kompetencje Doktorantki. Rozdział kończy krótki podrozdział *1.2. Przesłanki do podjęcia pracy*, w którym Autorka wyjaśniła motywację do podjęcia badań nad wyjaśnieniem roli adiponektyny w patogenezie RZS.

Doktorantka za cel badań obrała ocenę roli wybranych czynników prozapalnych w patogenezie RZS. Z uwagi na ostateczny wybór do dalszych badań adiponektyny, Autorka określiła 5 szczegółowych celów badawczych:

1. Ocenę stężenia ADPN w osoczu oraz jej ekspresji na poziomie mRNA w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.
2. Badanie korelacji między ekspresją ADPN w tkankach oraz jej stężenia w osoczu ze stężeniami wybranych mediatorów prozapalnych biorących udział w patogenezie RZS.
3. Badanie wpływu mediatorów stanu zapalnego LPS i TNF $\alpha$  na ekspresję ADPN w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów (hFLS).

4. Ocenę wpływu ADPN na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS, kluczowej cytokiny zaangażowanej w patogenezę RZS.
5. Badanie ekspresji receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) na poziomie mRNA oraz ocena lokalizacji ADPN i jej receptorów za pomocą analizy immunohistochemicznej w błonie maziowej oraz ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.

Główny cel pracy i cele szczegółowe zostały określone jasno i precyzyjnie oraz są realne do osiągnięcia.

Badania zostały przeprowadzone na grupie 17 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, 25 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (stanowią oni grupę kontrolną) oraz 30 zdrowych osobach (tylko do badań z wykorzystaniem osocza). Materiałem do badań były tkanki stawowe i szpik kostny pozyskane w czasie operacji endoprotezoplastyki oraz osocze. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (KB-0012/39/17). Dodatkowo, w pracy wykorzystano badania *in vitro* na kulturze tkankowej – ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów. Imponujący jest zakres metod badawczych wykorzystywanych przez Doktorantkę, który obejmuje badanie poziomu mRNA (qPCR), także w kulturach *in vitro* po stymulacji, pomiar stężenia cytokin i adiponektyny (technologia mikrokulek - Luminex), lokalizacja adiponektyny i jej receptorów (immunohistochemia). Badania eksperymentalne dopełnia szeroko zakrojona analiza statystyczna, w tym dotycząca ciekawych analiz korelacji pomiędzy stężeniem adiponektyny i prozapalnych cytokin. Dobór metod, ich opis oraz adekwatność ich zastosowania do postawionych celów nie budzą żadnych zastrzeżeń. Drobną uwagę dotyczy braku wskazania oprogramowania do analiz statystycznych.

Uzyskane rezultaty zostały przedstawione czytelnie i rzeczowo w formie opisowej oraz wykresów lub tabel. Całość rozdziału Wyniki została podzielona na 8 podrozdziałów, opisujących poszczególne etapy analiz. Pierwszy z nich dotyczy oceny ekspresji wybranych mediatorów stanu zapalnego (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 $\beta$ , IL-20, IL-23 i adiponektyny) w szpiku i tkankach stawowych pacjentów z RZS. Na podstawie tych wyników, Autorka podjęła decyzję o dalszych badaniach nad cząsteczką adiponektyny.

Kolejne podrozdziały dotyczą określenia poziomu adiponektyny w osoczu 3 badanych grup, korelacji między stężeniem adiponektyny (odpowiednio w osoczu, szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy) i cytokin prozapalnych, oceny poziomu ekspresji receptorów adiponektyny w tkankach stawowych, lokalizacji adiponektyny i jej receptorów (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych, skutków stymulacji ludzkich synowioocytów

o fenotypie fibroblastów mediatorami stanu zapalnego oraz oceny wpływu adiponektyny na ekspresję mRNA dla IL-6 w tych komórkach. Uzyskane rezultaty wskazują na:

1. wyższy poziom ekspresji genu kodującego adiponektynę w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy u pacjentów z RZS w porównaniu z chorymi na ChZS.
2. brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu kodującego adiponektynę w szpiku kostnym oraz w jej stężeniu w osoczu między grupami badanymi.
3. brak istotnych korelacji między stężeniem i ekspresją adiponektyny w tkankach i osoczym stężeniem wybranych mediatorów o charakterze prozapalnym.
4. brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji na poziomie mRNA receptorów adiponektynowych (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych pomiędzy pacjentami z RZS i ChZS.
5. nadekspresję w błonie maziowej stawu adiponektyny i jej receptorów na poziomie białka w grupie RZS w stosunku do grupy ChZS. W ciele tłuszczowym Hoffy obserwacja ta dotyczy jedynie AdipoR2.
6. znaczny wzrost ekspresji mRNA adiponektyny w ludzkich hFLS po stymulacji TNF i LPS.
7. wzrost ekspresji IL-6 w ludzkich hFLS po stymulacji adiponektyną lub adiponektyną w obecności LPS.

Dyskusja pracy to 11-stronicowe opracowanie, które dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Autorki obejmującej poruszane zagadnienia. Dyskusję rozpoczyna podsumowanie wyników badań własnych, dalej Doktorantka prowadzi spójną analizą otrzymanych rezultatów i zgrabną próbę ich interpretacji na podstawie dostępnych danych literaturowych. Konstrukcja Dyskusji potwierdza umiejętności Autorki w zakresie wykorzystania piśmiennictwa i krytycznego rozpatrywania zawartych tam danych na potrzeby interpretacji i analizy własnych dokonań. Wnioski z badań zostały zaprezentowane na zakończenie dysertacji, w Rozdziale 6. Autorka wysnuła 7 wniosków, przy czym 6 pierwszych wynika bezpośrednio z uzyskanych rezultatów badań eksperymentalnych, a siódmy jest konkluzją, że *„adiponektyna jest jednym ze składników kaskady zapalnej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów”*.



Pracę czytałam „*jednym tchem*”, ale w trakcie lektury nasunęły mi się pewne pytania i komentarze, zatem proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się, w czasie publicznej obrony, do następujących kwestii:

1. Przez lata choroba zwyrodnieniowa stawów uznawana była za chorobę związaną ze zużyciem chrząstki stawowej o podłożu mechanicznym. Obecnie, coraz więcej doniesień naukowych wskazuje na znaczny udział procesu zapalnego i czynników genetycznych w rozwoju ChZS. Jak mogło to wpłynąć na uzyskane rezultaty, gdzie chory na gonartrozę stanowili grupę kontrolną dla chorych na RZS – tu proszę o przytoczenie wyników dotyczących stężenia cytokin w osoczu u pacjentów z ChZS i RZS oraz wskazanie czy występowały różnice w poziomie oznaczanych cytokin. Te dane są również interesujące z uwagi na różnice w obserwowanej korelacji pomiędzy grupami (Tabele 7 i 8).
2. Określając kryteria wyłączające z badania zapisała Pani: „*U osób włączonych do badania zastosowano następujące kryteria wykluczenia: choroby autoimmunologiczne, ostre i przewlekłe stany zapalne*”. A dla mnie, to „niefortunny” zapis w kontekście kwalifikowania do badań pacjentów z chorobą autoimmunizacyjną z przewlekłe toczącym się stanem zapalnym.
3. We wstępie pracy wskazała Pani, że „*poziom ADPN u chorych na RZS nie zależał od masy ciała, mimo faktu, że adipokina ta jest produktem wydzielniczym adipocytów. Podwyższony poziom ADPN może być związany zarówno z otyłością, jak i niską masą ciała u chorych na RZS.*” W tym kontekście, dopytuję, czy posiada Pani dane osób uczestniczących w badania dotyczące BMI lub masy ciała? Jeśli tak, to czy badane grupy różniły się pod względem tego parametru? Często pacjenci przed endoprotezoplastyką są zobowiązani przez lekarza do zmniejszenia masy ciała – czy zna Pani jakieś doniesienia wskazujące na zmiany metabolizmu adipocytów, w tym poziomu ekspresji adiponektyny w czasie stosowania diety redukcyjnej?
4. Tabela 3 – proszę wyjaśnić rozwiązanie wykorzystane w prezentacji sekwencji starterów. Zazwyczaj, dla obu starterów (*forward* i *reverse*), podaje się sekwencje od końca 5' do końca 3'.

Poza wskazanymi uprzednio komentarzami, przedstawiam drobne uchybienia, które zauważyłam w przygotowanym tekście:

- str 30. – powinniśmy mówić o liczbie a nie ilości obrzękniętych stawów (jest to policzalne);

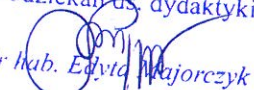
- str 35. – Krew – próbki osocza przechowywano raczej na potrzeby analizy biochemicznej a nie genetycznej;
- Autorka powinna zachować jednolity system wskazywania polimorfizmów genetycznych (np. dla *PTPN22* C1858T, a dla *TNF $\alpha$*  -489G/A)
- w spisach tabel i rycin zbędne są legendy (np. Panel A.....) – wystarczyło podać same tytuły;
- jedną z cytokin powinniśmy określać mianem TNF a nie TNF $\alpha$ ;
- nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne.

Niemniej jednak, całość pracy została przygotowana z niezwykłą jakością. Czyta się ją z ogromną przyjemnością, zarówno z uwagi na zawartość merytoryczną, jak również ogromną dbałość Autorki o stronę językową, redakcyjną i edycyjną.

Kilka powyżej wskazanych kwestii poddaję pod dyskusję, natomiast drobne uchybienia w żadnej mierze nie umniejszają jakości dysertacji, którą oceniam niezwykle wysoko. Praca jest poprawna pod względem merytorycznym i stanowi oryginalne rozwiązanie założonego problemu badawczego. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz konsekwencją w realizacji zadania badawczego. Pozyskane dane są bezsprzecznym uzupełnieniem wiedzy podstawowej w zakresie etiopatogenezy reumatoidalnego zapalenia stawów i stanowią podstawę do przygotowania rozwiązań praktycznych związanych z diagnostyką i opracowaniem metod leczenia RZS.

We wniosku końcowym, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Łącznej nt. „Rola czynników zapalnych w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 10 lipca 2018 r. – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Łącznej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

W związku z opublikowaniem wyników zawartych w rozprawie doktorskiej w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej (J Clin Med. 2022;11(10):2740. doi: 10.3390/jcm11102740) wnoszę o przyznanie mgr Małgorzacie Łącznej wyróżnienia *summa cum laude* zgodnie z przyjętymi w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie zasadami.

Prodzikan ds. dydaktyki  
  
 dr hab. Edyta Majorezyk