

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Łącznej pt.  
„Rola czynników zapalnych w patogenezie reumatoidalnego zapalenia  
stawów”**

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą zapalną tkanki łącznej. W jej przebiegu dochodzi do nieswoistego zapalenia błony maziowej wyściełającej staw, w konsekwencji także powiększania się i niszczenia przylegających struktur takich jak chrząstki, kości, więzadła, ścięgna. Nieleczony RZS prowadzi do destrukcji stawów i ciężkiej niesprawności, a także do uszkodzenia wielu narządów i w konsekwencji przedwczesnej śmierci chorych.

Pomimo wielu badań nad RZS, przyczyny tej choroby nie są w pełni poznane. Do rozwoju RZS może przyczyniać się wiele czynników. Do najważniejszych z nich można zaliczyć czynniki środowiskowe, w tym palenie papierosów, stres, zakażenia wirusowe i bakteryjne, jak również płeć (kobiety chorują znacznie częściej niż mężczyźni), defekty układu odporności, a także predyspozycje genetyczne.

Adiponektyna (ADPN) jest białkiem wydzielniczym komórek tkanki tłuszczowej. Główne funkcje ADPN wiążą się z metabolizmem glukozy i kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach szkieletowych. ADPN odgrywa również ważną rolę w procesach patologicznych poprzez modulowanie układu odpornościowego. W związku z tym, ADPN jest przedmiotem zainteresowania ze względu na dwojaki wpływ, jaki wywiera na procesy patologiczne. Przeprowadzone dotąd badania wykazują bowiem, że ADPN może odgrywać rolę zarówno przeciw jak i prozapalną.

W odniesieniu do RZS, ADPN może przyczyniać się do progresji chronicznego stanu zapalnego w obrębie tkanek stawowych, stymulując wydzielanie mediatorów prozapalnych. Przytaczając za autorką dysertacji *„nie wiadomo jednak, czy obserwowane podwyższone stężenia ADPN u pacjentów z RZS są jedną z głównych przyczyn rozwoju przewlekłego stanu zapalnego, czy też jego konsekwencją. Wciąż nie ustalono, w których tkankach chorych na RZS, ADPN wykazuje charakter prozapalny, ani które mediatory stanu zapalnego zwiększają ekspresję ADPN”*.

W świetle powyższych informacji, podjęta przez doktorantkę próba oceny roli adiponektyny w patogenezie RZS jest jak najbardziej słuszna i celowa.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Łącznej liczy łącznie 101 stron i zawiera spis 177 pozycji piśmiennictwa. Dysertacja zilustrowana jest 11 tabelami i 16 rycinami; zawiera również 5 stron indeksu skrótów/

skrótowców, 1 stronę spisu tabel, 2 strony spisu rycin, a także tożsame streszczenia w języku polskim i angielskim. Dysertacja ma układ charakterystyczny dla prac naukowych, w której występuje podział na rozdziały. Układ i proporcje poszczególnych części pracy są prawidłowe.

Pierwszą część pracy (strony 3-7) stanowi Wykaz skrótów stosowanych w pracy. W tym miejscu należy zwrócić uwagę autorce, że jest to *de facto* wykaz zarówno skrótów, jak i skrótowców. Skrótowcami nazywamy bowiem „*wyrazy pochodne (powstałe ze skrócenia wielowyrzowej nazwy, zwykle nazwy instytucji), funkcjonujące nie tylko w piśmie, lecz także w mowie. Skróty natomiast nie są wyrazami, lecz tylko sposobem zapisu wyrazów (lub ich połączeń), co można poznać po tym, że nie występują w języku mówionym. A zatem – skrótowce wymawiamy jako skrótowce, nie jako pełne nazwy, natomiast skróty wymawiamy jako całe słowa (lub ich połączenia)*” (Słownik Języka Polskiego PWN).

Pierwszym rozdziałem wydzielonym numerycznie jest Wstęp (strony 8-32), który podzielony został przez doktorantkę na 2 podrozdziały. W podrozdziale 1.1. pt. Reumatoidalne zapalenie stawów, który stanowi główną część Wstępu, doktorantka przedstawia bardzo wyczerpująco i rzeczowo aspekty teoretyczne związane z etiopatogenezą RZS, epidemiologią RZS, objawami klinicznymi RZS, diagnozowaniem RZS i leczeniem RZS. Ta część dysertacji jest bardzo ważnym elementem całości, gdyż pozwala czytelnikowi zapoznać się z problematyką RZS w taki sposób, aby nie pozostawiać u niego niedosytu wiedzy. Należy wyraźnie podkreślić, że ten fragment pracy doktorskiej jest popisem erudycji autorki, wskazując na jej dogłębną wiedzę dotyczącą omawianych zagadnień.

Tylko z powinności recenzenta przytoczono kilka przykładów nieściśłości polegających na wykorzystaniu skrótów myślowych czy też żargonu naukowego w tej części pracy. Na stronie 13 autorka podaje: „*Przypuszcza się, że czynniki te u osób z wrażliwym genotypem mogą doprowadzić do rozwoju pełnoobjawowego RZS*”. Zdaniem recenzenta, użyte sformułowanie „wrażliwy genotyp” jest żargonem naukowym wskazującym na genotyp (np. układ alleli genów/haplotypów), który zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia choroby.

Podane na stronie 16 przez autorkę dysertacji sformułowanie „...połączenie SNP w HLA-DR, PTPN22 i TRAF1-C5 zwiększa ryzyko zachorowania na RZS ponad 40-krotnie...”, powinno zdaniem recenzenta przyjąć formę „...wspólne występowanie predysponujących do RZS alleli/haplotypów zlokalizowanych w obrębie loci dla HLA-DR, PTPN22 i TRAF1-C5 zwiększa ryzyko zachorowania na RZS ponad 40-krotnie.”

Na tej samej stronie doktorantka zapisuje układy genotypowe dla polimorfizmu -238G/A w sposób prawidłowy np. -238 GG, jak również nieprawidłowy, tj -238G/A. Trzeba zaznaczyć, iż rozdzielenie alleli w zapisie wskazuje na rodzaj polimorfizmu (w tym przypadku transwersję guaniny w adeninę w pozycji -238), nie zaś na genotyp.

Na stronie 29, w paragrafie „Inhibitory TNF $\alpha$ ” podano kilkakrotnie błędną nazwę dla inhibitora TNF $\alpha$  tj. entanercept w miejsce etanercept. Podobnie na

stronie 31, błąd literowy wkraść się do nazwy inhibitora stymulacji limfocytów, tj. abatacept (podano adatacept).

Drugi rozdział stanowi Cel pracy, którym była ocena roli wybranych czynników prozapalnych w patogenezie RZS. Cel jest jasno sformułowany i w kontekście przedstawionych we wstępie wiadomości jest jak najbardziej zasadny. Dalej doktorantka uszczegóławia, że celem była próba oceny roli jaką pełni adiponektyna w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Autorka wskazuje, że dokonała selekcji ADPN na podstawie analizy, cytuję „*po przeprowadzeniu wstępnej analizy do dalszych badań wybrano adiponektynę*”, jednakże nie podaje jaki rodzaj analizy został przeprowadzony (o tym czytelnik dowiaduje się w dalszych rozdziałach pracy). ADPN została co prawda dokładnie scharakteryzowana w podrozdziale 1.1.1.5. Wstępu, jednakże istnieje jeszcze całkiem pokaźne spektrum mediatorów stanu zapalnego biorących lub mogących brać udział w etiopatogenezie RZS. Biorąc pod uwagę powyższe bardziej zasadnym wydaje się, aby treść przedstawiona w podrozdziale 1.2. zatytułowanym „*Przełanki do podjęcia pracy*” rozbudować o dodatkowe argumenty popierające słuszność wyboru adiponektyny i całość umieścić w rozdziale Cel pracy.

W rozdziale 3 (strony 34-44) doktorantka skrupulatnie opisała wszystkie wykonane w trakcie prac laboratoryjnych procedury. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały, tj. Materiał (3.1.) i Metody (3.2.). W podrozdziale Materiał autorka opisała wykorzystany w pracy materiał biologiczny (błona maziowa, ciało Hoffy, szpik kostny, krew) pochodzący od 17 pacjentów z RZS (grupa badana), 25 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa kontrolna) oraz 30 osób zdrowych (osocze), a także linie komórkowe (ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów). Szkoda, że poza wiekiem osób badanych doktorantka nie podała dodatkowych danych medycznych pacjentów np. BMI. Zastanawia także brak podstawowych danych odnośnie osób zdrowych, od których doktorantka pozyskała osocze. Pani mgr powinna również podać argumentację wyboru pacjentów z CHZS jako grupy kontrolnej.

Następnie w podrozdziale Metody opisano w kolejności: izolację RNA, odwrotną transkrypcję, RealTime-PCR. Przedstawiono metody oceny stężenia białek w osoczu, immunohistochemicznej lokalizacji adiponektyny i receptorów dla adiponektyny w tkankach, stymulacji komórek hFLPS oraz metody statystyczne. Podsumowując, zastosowane procedury zostały opisane starannie i, z pewnymi wyjątkami, nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

Poniżej przedstawiam swoje uwagi do tej części pracy. Wszystkie odczynniki i sprzęt wykorzystany w dysertacji powinien być opisany w taki sposób, aby wiadoma była nazwa producenta oraz kraj pochodzenia. W podrozdziale 3.2.3., autorka opisuje metodę ilościowego oznaczania mRNA, m.in. za pomocą techniki łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Doktorantka podaje, że absolutną wartość ekspresji dla danego genu wyrażano jako  $2^{-\Delta Ct}$ . Według wiedzy recenzenta zastosowanie powyższego sposobu obliczeń wskazuje, że oznaczenia

poziomu stężeń badanego kwasu nukleinowego w poszczególnych próbach wykonano metodą względną (relatywną) w odmianie porównawczej (komparatywnej). Metoda ta oparta jest na modelu matematycznym, który umożliwia wyliczenie relatywnej różnicy poziomu ekspresji genu poddanego analizie między badanymi próbkami (w tym przypadku pomiędzy grupą badaną - RZS i kontrolną CHZS). Ocena wartości absolutnej ekspresji, na którą powołuje się autorka oparta jest na założeniu, że wartość stężenia (poziom ekspresji) prób kalibracyjnych jest znany i wyrażony w stosownych jednostkach, np. liczby kopii sekwencji na jednostkę objętości ( $\mu\text{l}$ ). W odniesieniu do rozdziałów 3.2.4. doktorantka nie podała czym kierowała się przy wyborze 16 cytokin o charakterze zapalnym, które zamierzała zbadać w próbkach osocza (Tabela 4). Analogicznie, autorka dysertacji nie określiła kryteriów wyboru stężeń czynników stymulujących (TNF $\alpha$  i LPS, Tabela 5 oraz LPS i ADPN Tabela 6).

Rozdział 4 (strony 45-62) przynosi bardzo rzeczową dokumentację uzyskanych w trakcie analiz wyników badań. Należy podkreślić, że opracowanie obszernego materiału zawierającego liczne zmienne poparte jest graficzną prezentacją w postaci wykresów oraz tabel, co znacząco zwiększa czytelność tej części pracy. Podrozdział 4.1 opisuje efekt oceny ekspresji mediatorów stanu zapalnego w próbkach szpiku kostnego błony maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy. Z tego podrozdziału dowiadujemy się, że spośród 7 wybranych przez doktorantkę mediatorów stanu zapalnego tj. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 $\beta$ , IL-20, IL-23 oraz ADPN, tylko IL-20 i ADPN wykazały istotny statystycznie wzrost ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu u do CHZS.

W związku z tym, cytuję „*na podstawie dokonanych obserwacji dotyczących zmiany w poziomie ekspresji ADPN między grupami RZS i ChZS oraz niejednoznaczności funkcji, jaką ADPN pełni w przebiegu RZS do dalszych analiz wybrała właśnie adiponektynę.*” Następnie autorka dokonała oceny stężenia ADPN w osoczu (podrozdział 4.2), skorelowała stężenie ADPN z wybranymi cytokinami o charakterze zapalnym (podrozdział 4.3), zbadała korelację między ekspresją ADPN w tkankach stawowych i szpiku kostnym, a stężeniami wybranych cytokin o charakterze prozapalnym (4.4). W dalszej kolejności oceniono ekspresję receptorów ADPN AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych (4.5), oceniono lokalizację ekspresji ADPN oraz jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych (4.6) i finalnie przeprowadzono ocenę stymulacji komórek hFLS mediatorami stanu zapalnego TNF $\alpha$  i LPS (4.7), a także wpływu adiponektyny na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS (4.8). Podsumowując tę część pracy, należy wielce docenić pracowitość, sumienność i skrupulatność doktorantki. Konieczne jest także podkreślenie bogatego warsztatu pracy autorki związanego z wykorzystaniem wielu technik i metod, co w konsekwencji wiąże się z ogromem wykonanych przez nią prac laboratoryjnych zmuszających do wielkiej samokontroli (m.in. w celu uniknięcia błędów, których popełnienie niestety jest możliwe na każdym etapie analizy).

Wszystkie uzyskane i opisane przez autorkę dysertacji wyniki zostały skonfrontowane z danymi literaturowymi w rozdziale Dyskusja (strony 63-73). Rozdział ten napisany jest w sposób przejrzysty i świadczy o dojrzałości i samodzielności doktorantki, która wykazała się bogatą wiedzą z zakresu nauk klinicznych, biochemii, fizjologii i biologii molekularnej. Należy stwierdzić z całą stanowczością, że autorka posiada umiejętność posługiwania się zdobytą wiedzą, którą w pełni wykorzystała do oceny swoich wyników i przedyskutowania ich z rezultatami innych grup badawczych.

Następnie, na podstawie uzyskanych wyników badań doktorantka postawiła 7 wniosków. W ocenie recenzenta wnioski 1-6 są bardziej opisami wyników obserwacji niż wnioskami, np. wniosek nr 1. „pacjenci z reumatoidalnym zapaleniem stawów w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy mają zwiększony poziom ekspresji mRNA adiponektyny w porównaniu z grupą kontrolną” czy też wniosek nr 3 „nie zaobserwowano istotnych różnic między poziomem ekspresji mRNA receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych pomiędzy pacjentami z reumatoidalnym zapaleniem stawów i chorobą zwyrodnieniową stawów”. Zdaniem recenzenta, prawidłowo sformułowano wniosek nr 7, tj. „badania sugerują, że adiponektyna jest jednym ze składników kaskady zapalnej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów”. W związku z powyższym wnioski 1-6 należałoby przeformatować stylistycznie.

Powolywanie się na literaturę oraz sporządzenie spisu literatury. W pracy doktorantka przyjęła system vancouver (lub systemem autor-numer), jako sposób podawania odwołań do publikacji źródłowych. Oznacza to, że powołanie na informacje zawarte w źródle zwieńczone zostało odsyłaczem cyfrowym do cytowanej publikacji, a bibliografię sporządzono zgodnie z kolejnością cytowania w tekście. System ten jest stosowany przez autorkę pracy prawidłowo. Spis literatury zawiera 177 pozycji ze zdecydowaną przewagą tytułów anglojęzycznych. Przygotowany jest starannie, a doktorantka konsekwentnie stosuje raz przyjęty sposób zapisu publikacji źródłowych.

Podsumowując należy przyznać, że większość uwag zawartych w recenzji, to uwagi o charakterze redakcyjnym lub przedstawiające subiektywny punkt widzenia recenzenta. Nie umniejszając w niczym wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Łącznej. Należy ponownie podkreślić, że praca ma bez wątpienia charakter poznawczy w kontekście poszerzenia wiedzy dotyczącej roli adiponektyny w etiopatogenezie RZS.

Odpowiednio określone cele badawcze, szczegółowo zaplanowane i drobiazgowo przeprowadzone badania, prawidłowa interpretacja wyników, a także wysnute, z pewnym niedociągnięciami, wnioski wskazują na bardzo dużą znajomość tematyki badawczej i świadczą o tym, że doktorantka może być uznana za dojrzałego pracownika naukowego. Uważam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Małgorzaty Łącznej w pełni spełnia wszystkie wymagania rozprawy doktorskiej określone w ustawie o Szkolnictwie Wyższym. Wnoszę więc do Wysokiej Rady

Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Łącznej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek Sawczuk

