

**Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób
Wewnętrznych**

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. dr hab. med. Wiesław Wiktor Jędrzejczak

Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

Telefon/Telefax: (22) 599-28-18

Warszawa, dnia 17.01.2017

**Opinia o rozprawie doktorskiej mgr Marceliny Grabowskiej pt.
„Odpowiedź immunologiczna u dzieci z cukrzycą typu 1 leczonych
adoptywnie limfocytami T regulatorowymi
CD3(+)CD4(+)CD25(high)CD127(-)”**

Przesłana do oceny praca składa się ze 132 stron i typowych dla tego typu opracowań części tj. ze wstępu, celów pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, streszczenia w języku polskim i angielskim, spisu rycin i tabel oraz piśmiennictwa. Praca jest poprzedzona spisem treści oraz wykazem najważniejszych skrótów używanych w publikacji. Zawiera 18 tabel, 33 ryciny i 138 pozycji piśmiennictwa.

We wstępie liczącym 27 stron, doktorantka komunikatywnie i jasno przedstawia szerokie spektrum zagadnień dotyczących zarówno cukrzycy typu 1 jak i limfocytów T regulatorowych. Doktorantka wprowadza czytelników w zagadnienie cukrzycy przechodząc następnie do bardzo szczegółowo przedstawionej epidemiologii, co podkreśla potrzebę kliniczną prowadzonych badań. Następnie, przedstawia czynniki ryzyka rozwinięcia cukrzycy typu 1 oraz możliwe mechanizmy, włączając genotyp w zakresie układu HLA, który jest m.in. przedmiotem dalszych badań. Omawia dalej diagnostykę cukrzycy typu 1, dyskutując rolę peptydu C i autoprzeciwciał, a także zaburzenia mechanizmów immunologicznych w rozwoju cukrzycy. Dalsza część wstępu poświęcona jest limfocytom T regulatorowym. Należy podkreślić, że badania wykonywane są pod opieką promotora, prof. dr hab. Piotra Trzonkowskiego, który jest wybitnym ekspertem w tej dziedzinie, a doświadczenie Zakładu w którym wykonywane są badania jest unikalne pod tym względem w skali świata. Omówione zostały rodzaje limfocytów T regulatorowych i ich markery: jądrowy czynnik transkrypcyjny P3 (FoxP3), cząsteczka CD25, antygen CD127, antygen CD45RA oraz cząsteczka CD62L.

Następnie, czytelnik płynnie wprowadzany jest w rozważania dotyczące roli limfocytów Tregs w patogenezie cukrzycy oraz ich potencjalnego zastosowania w terapii różnych chorób. Wstęp w doskonały sposób przygotowuje czytelnika niezaznajomionego z tematem do wczytania się w dalszą część rozprawy. Nie uniknięto drobnych błędów stylistycznych, o czym będzie mowa w dalszej części recenzji. Warto było by też umieścić informację o uzyskaniu zgody autorów rycin (które na ogół nie są dziełem autora i pochodzą z cytowanych publikacji) na wykorzystanie tych materiałów w dysertacji.

Celem pracy była ocena odpowiedzi immunologicznej po podaniu namnożonych *ex vivo* limfocytów Tregs, identyfikacja czynników mających wpływ na skuteczność terapii komórkami Tregs oraz oszacowanie związku antygenów zgodności tkankowej HLA z przebiegiem terapii Tregs. Cele zostały klarownie sprecyzowane, choć w opinii recenzenta cel 1 pt. „ocena odpowiedzi immunologicznej na terapię komórkową cukrzycy typu 1 w oparciu o namnożone sztucznie limfocyty...” został sformułowany w sposób nieco mylący, co mogło by sugerować, że terapia za pomocą Tregs ma indukować odpowiedź immunologiczną.

Badania zostały przeprowadzone w ramach badania klinicznego obejmującego grupę 12 pacjentów z cukrzycą typu 1 leczonych infuzjami Tregs. Wykorzystano dane dotyczące charakterystyki pacjentów, dane kliniczne, a przede wszystkim liczne oznaczenia w oparciu o próbki krwi grupy badanej. Wyniki analizowane były w odniesieniu do grupy kontrolnej, którą stanowiło 10 pacjentów z cukrzycą typu 1 nie leczonych Tregs, dopasowanych pod względem wieku, płci i czasu trwania choroby. Do badań HLA wykorzystano materiał od większej grupy, 31 pacjentów z cukrzycą typu 1. Osobne analizy wykonywane były w podgrupie pacjentów leczonych pojedynczą dawką Tregs i dwoma dawkami Tregs. W sekcji Materiały i Metody przedstawiono charakterystykę kliniczną chorych, kryteria wyłączenia pacjentów z badania, protokół badawczy w skrócie oraz schemat wykonywanych obserwacji. W opinii recenzenta zabrakło być może równie klarownego przedstawienia kryteriów włączenia do badania. Wykorzystywane materiały zostały przedstawione w sposób przejrzysty w postaci tabeli. W dalszej części przedstawiono szczegółowo wykorzystywane metody, w tym izolację DNA metodą kolumnową, typowanie HLA metodą PCR-SSP, cytometrię przepływową, uzyskiwanie surowicy i oznaczanie autoprzeciwciał oraz oznaczanie cytokin za pomocą techniki Multiplex na aparacie Luminex. Dla pełnej satysfakcji recenzenta, zabrakło w wielu przypadkach dokładnego opisanie wykorzystywanych odczynników i sprzętu według obowiązujących standardów (nazwa-producent-kraj).

Wyniki będące przedmiotem rozprawy obejmują: ocenę funkcji komórek beta trzustki, odsetek limfocytów Tregs we krwi obwodowej po zastosowanej terapii, analizę ich populacji,

korelację ze stężeniem interleukiny 2, interleukiny 6, interleukiny 1 i czynnika martwicy nowotworów alfa w surowicy pacjentów. Ponadto, przedstawiono szczegółową analizę alleli HLA w wybranej populacji oraz obecność autooprzeciwciał. Wpływ terapii limfocytami Treg na funkcje komórek beta trzustki oceniano obserwując stężenia C-peptydu, zapotrzebowania na dobową dawkę insuliny, poziom glukozy na czczo, odsetek glikowanej hemoglobiny oraz reakcję na test tolerancji glukozy z zastosowaniem posiłku mieszanego. Przedstawione wyniki utwierdzają czytelnika w przekonaniu, że terapia za pomocą generowanych *ex vivo* Tregs ma przemijający wpływ protekcyjny względem komórek beta trzustki, co widoczne jest zwłaszcza w 4 miesiącu i po roku od zastosowanej terapii, podczas gdy efekt ten przemija w okresie późniejszym. Wykazano, że po 2 latach nie występuje już korelacja pomiędzy liczbą Tregs we krwi obwodowej a stężeniem peptydu C. To sugerowało by potrzebę np. powtarzania terapii. Szczególnie obiecująco przedstawiają się skutki leczenia dwoma dawkami Tregs, zwłaszcza w zakresie zmniejszenia zapotrzebowania na insulinę.

Bardzo ciekawe i istotne klinicznie spostrzeżenie dotyczy analizy ekspresji FoxP3 w populacji limfocytów CD3+CD4+CD25^{high}CD127(-) we krwi obwodowej pacjentów po zastosowanej terapii. Populacja ta uważana jest niejako za ekwiwalent limfocytów Tregs o fenotypie CD3+CD4+FoxP3+, jednak w odróżnieniu od niej nie wymaga barwienia wewnątrzkomórkowego i dlatego służy do izolacji żywych Tregs. Zaobserwowano, że ekspresja FoxP3 w tej populacji spada w czasie rozwoju cukrzycy. Jako, że funkcja białka FoxP3 wydaje się zasadnicza dla funkcjonowania Tregs, może to wskazywać na osłabienie ich funkcji. Obserwowano wzrost liczby limfocytów FoxP3 po terapii, utrzymujący się przez kilka miesięcy, co może świadczyć o tym, że komórki te utrzymują się w organizmie. Wydaje się, że za efekt supresorowy Tregs odpowiada ich frakcja CD62L+CD45RA+ tj. frakcja limfocytów Tregs naiwnych. Co ciekawe, zaobserwowano, że w grupie kontrolnej w trakcie trwania obserwacji dochodziło do konwersji Tregs naiwnych do Tregs typu pamięci centralnej. O ile zjawisko to zaobserwowano też w grupach leczonych, to przy podaniu 2 dawek, było ono wyraźnie mniej wyrażone. Przedstawiona analiza stężenia cytokin w surowicy po podaniu Tregs wykazała, że pomimo zastosowania terapii, stężenie IL-2, IL-6, IL-1 i TNF-alfa ustawicznie wzrastało, podobnie jak w grupie kontrolnej. Co jednak intrygujące, bezpośrednio po infuzji Tregs, spadało stężenie IL-2, IL-1 i TNF-alfa, co może być związane z aktywnością tych komórek. Niestety w rozprawie nie przedstawiono wyników pomiaru pozostałych cytokin, które były oznaczane (IL-4, 8, 10, 12, IFN γ , VEGF). Badanie antygenów HLA w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1 wykazało występowanie genotypu tzw. DR3/DR4, którego korelację z występowaniem tej choroby wcześniej opisano.

Dodatkowo, doktorantka wykazała, że w grupie tej częste jest występowanie antygenu HLA-A*02 i *24. Badane grupy nie różniły się stężeniem autoprzeciwciał GAD, IA2, IAA oraz ZnT8 – szkoda jednak, że w rozprawie zamieszczono jedynie komentarz na ten temat, a nie wyniki. Intrygujący wydaje się fakt stwierdzenia odwrotnej korelacji pomiędzy odsetkiem Tregs a stężeniem przeciwciał IA2, co może tłumaczyć patomechanizmy choroby.

Dyskusja jest przedstawiona jasno i rzetelnie. Doktorantka omawia poszczególne grupy wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych, wyciągając też własne wnioski i sugerując dalsze kierunki badawcze. Na stronie 102 znalazł się jednak wniosek dotyczący najlepszej reakcji na terapię ze strony dzieci o krótkim czasie trwania choroby i poziomie C peptydu na czczo ≥ 0.7 ng/ml, podczas, gdy wcześniej nie przedstawiono wyników, które by to wykazywały. Na zakończenie, doktorantka dyskutuje perspektywy adoptywnej immunoterapii z zastosowaniem Tregs w cukrzycy typu 1. Ciekawy wydaje się poruszany wątek dotyczący leczenia IL-2 *in vivo* po podaniu Tregs tak, aby wzmocnić i podtrzymać ich funkcję. W dyskusji zabrakło być może modnych ostatnio strategii wzmaganie aktywności Tregs *in vivo* bez ich wcześniejszej izolacji np. za pomocą ciągłego wlewu niskich dawek IL-2. Co ważne, doktorantka przedstawia też alternatywne sposoby immunomodulacji w cukrzycy typu 1 np. za pomocą transplantacji autologicznych komórek krwiotwórczych, jak też spojrzenie na transplantację wysepek trzustkowych i trzustki. Jako podsumowanie dyskusji, zabrakło niestety w sposób klarowny wypunktowanych wniosków. Można jako takie podsumowanie potraktować jednak ostatni akapit, w który doktorantka stwierdza że:

- Terapia za pomocą Tregs jest bezpieczna;
- Jeśli jest stosowana wcześniej, chroni wyspy trzustkowe przed autoagresją;
- Progresja choroby związana jest ze zmianą subpopulacji Tregs z naiwnych na limfocyty centralnej pamięci oraz ze wzrostem stężenia cytokin prozapalnych;

Prawidłowo została postawiona końcowa konkluzja, że terapia ta może znaleźć zastosowanie zwłaszcza w zapobieganiu progresji świeżo wykrytej cukrzycy typu 1.

Praca doktorska nie jest wolna od drobnych błędów i uchybień, a obowiązkiem recenzenta jest je wypunktować. Są to:

- błędy edytorskie:
 - o nazwy angielskie w nawiasach powinny zaczynać się od małej litery (np. nie „ang. Gestational diabetes mellitus...” str. 15),
 - o niektóre akapity rozpoczynają się wcięciem, inne nie. Należało by zdecydować się na jeden styl,

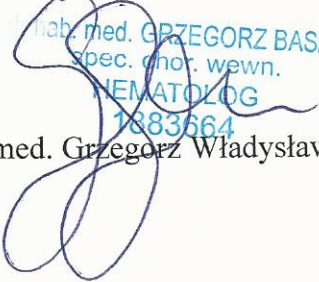
- niekiedy nazwa „limfocyty” pisana jest z dużej litery, z niewiadomego powodu,
 - Zwroty łacińskie np. „in vitro” powinny być pisane kursywą, a nie zawsze są,
 - Nazwa białka FoxP3 jest pisana niekonsekwentnie – czasami literami drukowanymi,
 - str. 41: „zapobiegają graft-versus-host disease” – powinna być stosowana nazwa polska,
 - str. 61: ostatnie zdanie pierwszego paragrafu zaczyna się i kończy od przecinka,
 - str. 77 „Hb1C” powinno być „HbA1C”,
 - projekt ryciny 14 odbiega od podobnych pozostałych tj. opis czasu oznaczania parametru umieszczony jest w legendzie, a nie na osi X,
 - ryciny opisane są jako „Rysunki”. Wydaje się, że słowo „Rycina” jest bardziej przystające do rozprawy doktorskiej,
 - rycina 17 – w opisie osi X użyte jest angielskie słowo „day” zamiast „dzień”,
 - w opisie wyników brak jest wyraźnego odniesienia do określonych rycin,
 - dyskusja rozpoczyna się od skrótu T1D (type 1 diabetes), a nie powinno się zaczynać zdania od skrótów,
 - Skróty nazw cytokin nie są pisane konsekwentnie np. IL-2 lub IL2 (bez myślnika).
- błędy gramatyczne:
- np. „Największym **prawdopodobieństwem** wystąpienia cukrzycy typu 1 **określa się przez** obecność...” str. 23,
 - „takie badania pozwoliłyby na poprawę **przewidywania rozwoju** cukrzycy typu 1 z **wybranych** kohort...” str. 25,
 - str. 36: „w przeciągu ostatnich latach”,
 - str. 47: „zgodnie z Deklaracją Helsinkach” powinno być „zgodnie z Deklaracją Helsińską”.
 - str. 59: nie pokuszono się o polskie tłumaczenie słowa „annealing”,
 - str. 76 dolny akapit: „podawania insulina” powinno być „insuliny”,
 - często wykorzystywane jest sformułowanie „poziom” danej substancji, podczas, gdy powinno to być „stężenie”, np. str. 78 „obie grupy

- charakteryzowały się lepszym poziomem” – powinno być „wyższym stężeniem”,
- str. 101: wydaje się, że sformułowanie „namnożone sztucznie limfocyty” nie jest właściwe, raczej sugerował bym użycie słowa „*ex vivo*”,
 - str. 103, tytuł „...limfocytów T regulatorowe...” powinno być „regulatorowych”,
 - str. 109: „allogenicznych” powinno być „alogenicznych”,
 - str. 109: znalazł się tam niewłaściwy eufemizm „terapia... nie uzdrawia z chorób...”,
 - str. 110: „przeszczep autologicznych komórek macierzystych”, podczas gdy powinno się mówić o „przeszczepieniu” jako czynności,
 - str. 111: „Badania na podawaniu Tregs” – powinno być „Badania dotyczące podawania...”,
 - str. 117: „Niemniejsza rozprawa” powinno być „Niniejsza”,
 - nie zrozumiałe jest sformułowanie w streszczeniu, str. 117 „Poziom IL-6 wzrósł we wszystkich badanych grupach natomiast poziom IL1 i TNFalfa dodatkowo wzrosły także w grupie nieleczonych pacjentów” – z danych wynika raczej, że stężenia wszystkich tych cytokin wzrosły we wszystkich grupach, włączając nieleczonych,
 - streszczenie str. 119: „selfreactvated T cells” powinno być „self-reactive lub auto-reactive”. Wersja anglojęzyczna abstraktu nie jest niestety bezpośrednim tłumaczeniem polskiego streszczenia, co jednak nie zmienia wartości merytorycznych,
 - obecnie nie stosuje się już raczej terminu „limfokiny” (str. 30) a ogólnie, cytokiny,
 - niewłaściwe jest też sformułowanie „receptor łańcucha alfa IL-2” (str. 31) – powinno być „łańcuch alfa receptora IL-2”,
 - strona 36: „myszy umierają” – słowo umierać stosuje się raczej tylko do człowieka, w przypadku myszy powinno być np. „giną”.

Powyższe drobne uchybienia nie umniejszają jednak ogromnej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji pracy.

Reasumując, uważam że mgr Marcelina Grabowska wykonała badania o bardzo dużym znaczeniu praktycznym i poznawczym, powiększające naszą wiedzę o zaburzeniach układu odpornościowego prowadzących do rozwoju cukrzycy typu 1 oraz o bezpośrednim

wpływie terapii adoptywnej za pomocą generowanych *ex vivo* limfocytów regulatorowych na układ odpornościowy pacjentów z cukrzycą. Badania Doktorantki niewątpliwie przybliżają nas do klinicznego zastosowania tej zaawansowanej technologicznie metody w leczeniu choroby o dużym znaczeniu społecznym. Rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014r. – Dz. U. poz. 1852). Tym samym, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.


dr hab. med. GRZEGORZ BASAK
spec. chor. wewn.
NEMATOLOG
1883664
dr hab. med. Grzegorz Władysław Basak