

Prof. dr hab. n. med. **Joanna Domagała- Kulawik**  
Katedra i Klinika  
Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Banacha 1a, 02 097 Warszawa

Warszawa, 2022-08-09

Ocena Rozprawy Doktorskiej

Lekarza medycyny **Bartłomieja Rękawieckiego**

p.t.

**ANALIZA PORÓWNAWCZA POLIMORFIZMU GENÓW *FCGR* W SARKOIDOZIE I  
GRUŻLICY PŁUC**

Promotor

Prof. dr hab. N. med. Anna Dubaniewicz

Gdański Uniwersytet Medyczny  
Klinika Pneumonologii

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy podłoża genetycznego ryzyka rozwoju sarkoidozy i gruźlicy.

**Wprowadzenie, przesłanki**

Doktorant podjął się badania bardzo ważnego zagadnienia diagnostyki różnicowej sarkoidozy i gruźlicy płuc na poziomie genetycznym. Jednocześnie, dzięki starannej analizie materiału klinicznego badanie dotyczyło różnych stadiów sarkoidozy, jak wiadomo choroby niejednorodnej. Praktyka kliniczna wskazuje na występujące nadal trudności diagnostyczne obu chorób. Przyczyny tych trudności można niejako podzielić na wewnętrzne- obraz kliniczny jest podobny, objawy mało charakterystyczne, zdarza się przebieg bezobjawowy. Trudności diagnostyczne mogą wynikać również z małej dostępności materiału do uzyskania pewnego rozpoznania choroby (na przykład materiał biologiczny do badania bakteriologicznego w przypadku gruźlicy). Należy również pamiętać o dynamice przebiegu procesów chorobowych, co nam niekiedy umyka przy „podręcznikowym” podejściu do diagnostyki. Niestety, trudności w rozpoznawaniu, w szczególności sarkoidozy, wynikają

niekiedy z przyczyn „zewnętrznych”: braku wiedzy na temat tej choroby, standardów diagnostycznych czy doświadczenia oraz dostępności nowoczesnych metod diagnostycznych. W efekcie w pewnej liczbie przypadków obie choroby pozostają bez pewnego potwierdzenia. Co więcej, mogą współwystępować, co komplikuje postępowanie diagnostyczno- lecznicze. Badanie porównawcze obu jednostek jest bardzo cenne tym bardziej, że nie tylko obraz kliniczny zajął się, ale czynnik etiologiczny- *Mycobacterium tuberculosis* jest pewny w gruźlicy i domniemany w przypadku sarkoidozy. Podjęcie tego tematu przez Doktoranta wynika również z ogromnego doświadczenia pani Promotor. Dotychczasowe wyniki zmudnych badań nad etiopatogenezą sarkoidozy dały świetną podstawę do podjęcia obecnej pracy badawczej.

Badania przeprowadzone przed Doktoranta dotyczyły podłoża genetycznego odpowiedzi układu odporności w obu chorobach, w szczególności funkcji komórek biorących udział w oczyszczaniu procesu zapalnego. Jest to proces wielopoziomowy i jego zaburzenie może prowadzić do rozwoju zapaleń przewlekłych, w tym autoimmunizacyjnych z tworzeniem odczynów swoistych. A więc nie sam patogen czy czynnik zewnętrzny a spaczona odpowiedź na jego wtargnięcie jest istotą takiego zapalenia. Zbadanie podłoża genetycznego ukierunkowania odpowiedzi układu odporności może pomóc wyjaśnić jakiego typu schorzenia i przebiegu choroby możemy się spodziewać. Znaczenie omawianej pracy badawczej jest niezwykle ważne w dobie szybkiego rozwoju leczenia biologicznego jaki obecnie obserwujemy.

Dodatkowe znaczenie podjętej pracy dotyczy wykazania, że w obrębie jednej jednostki chorobowej mogą przebiegać odmienne procesy. Sarkoidoza nie jest chorobą jednorodną, ma również różne czynniki etiologiczne. Ale także gruźlica charakteryzuje się bardzo różnym przebiegiem klinicznym przy jednym czynniku etiologicznym. Te obserwacje podkreślają znaczenie funkcji układu odporności, które zdają się regulować fenotyp choroby. Badanie polimorfizmu genów receptorów Fcy dotyczyło komórek biorących udział w ograniczaniu ogniska zapalnego i obronie przeciw patogenom: monocytów, makrofagów, granulocytów obojętnochłonnych, komórek NK. Doktorant podjął się zbadania bardzo ważnego obszaru w zakresie chorób odrębnych, lecz których patomechanizm zajął się.

### **Forma Rozprawy**

Praca lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego ma układ klasyczny i właściwy dla rozprawy doktorskiej, liczy 182 strony, zilustrowana jest 45 rycinami. Dane zostały przedstawione w 24 tabelach. Rozprawę otwiera spis treści. Następnie przedstawiono wyczerpujące wyjaśnienie stosowanych skrótów w języku angielskim i polskim. Kolejne rozdziały, to Wstęp, Cele pracy,

Materiał badawczy, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenia: polskie i angielskie, Spis tabel i rycin. We Wstępie, na 45 stronach opisano szczegółowe dane dotyczące sarkoidozy i gruźlicy w zakresie: historii, definicji, epidemiologii, charakterystyki klinicznej, etiopatogenezy oraz czynników środowiskowych obu chorób. W ostatnim podrozdziale omówione zostały receptory Fcγ: ich charakterystyka, znaczenie funkcjonalne w sarkoidozie i gruźlicy oraz polimorfizm genów kodujących te receptory. Ten fragment Wstępu jest bardzo istotny, ułatwia bowiem zrozumienie istoty przeprowadzonego przez Doktoranta badania. Cel pracy został przedstawiony w 5 pytaniach wyłaniających się z przesłanek. Opis materiału badawczego obejmuje opis grup badanych, zaś metody opisano bardzo starannie przedstawiając wykaz odczynników i producentów, następnie poszczególne etapy przeprowadzonych badań genetycznych. Wyjasniono dobór metod statystycznych. Wyniki, na 40 stronach, prezentują efekty badania poszczególnych alleli i genotypów genów oraz kopii genów: *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* i *FCGR3B* w sarkoidozie, gruźlicy i u osób zdrowych, wyniki analizy porównawczej sarkoidoza- gruźlica- osoby zdrowe oraz dla poszczególnych stadiów sarkoidozy, również w porównaniu do pozostałych grup badanych. Wyniki przedstawiono w tabelach oraz na wykresach słupkowych czytelnie oznaczając kolorami poszczególne grupy badane i zaznaczając różnice istotne statystycznie. Dodatkowo przykłady amplifikacji fragmentów każdego z badanych genów zostały zilustrowane fotografiami. W Dyskusji Doktorant odniósł się do poszczególnych wyników i w drugiej części podsumował całość badania. Wnioski ujęte w 6 punktach odpowiadają na zadane cele pracy. Spis piśmiennictwa obejmuje 414 pozycji wymienionych w kolejności cytowania w tekście pracy.

### **Opis szczegółowy metodyki i wyników Rozprawy Doktorskiej**

Przedmiotem badania przeprowadzonego przez lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego była ocena polimorfizmu genów kodujących receptory dla immunoglobuliny G występujące na komórkach układu odporności, głównie komórkach biorących udział w prezentacji antygenów, obronie organizmu i oczyszczaniu ognisk zapalnych. Są to receptory Fcγ na makrofagach, granulocytach obojętnochłonnych, komórkach NK i w mniejszym stopniu eozynofilach, płytkach krwi czy limfocytach. Badano geny dla receptorów: FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, i FcγRIIIa, FcγRIIIb. Zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy z użyciem starterów specyficznych dla poszczególnych alleli badanych genów oraz reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Istotą badania było porównanie polimorfizmu genów pomiędzy chorymi na sarkoidozę i gruźlicę, przy czym wyniki odnoszono do grupy kontrolnej. Były to liczne grupy osób chorych i zdrowych, odpowiednio: 154, 179 i 148 osób, bardzo starannie dobrane i, co bardzo ważne, niespokrewnione, pochodzące z jednego obszaru Polski.

Stosując odpowiednie metody badań genetycznych określono częstość występowania alleli i genotypów poszczególnych genów kodujących wymienione receptory. W pierwszym etapie analiz porównywano częstość występowania danych alleli i genotypów pomiędzy chorymi na sarkoidozę i gruźlicę i osobami zdrowymi. Następnie dokonano podziału chorych na sarkoidozę na poszczególne stadia: I-IV oraz pogrupowano te stadia, jako: I/II i III/IV. Wyniki badań genetycznych porównano pomiędzy tymi grupami, oraz poszczególne grupy z chorymi na gruźlicę i zdrowymi dla każdego genu. Zbadano również częstość występowania liczby kopii genów w badanych grupach.

Odnosnie genu *FCGR2A* dla receptorów występujących głównie na makrofagach, neutrofilach wykazano znaczenie genotypów 131HR i 131HH. Gen *FCGR2B* koduje jedyny receptor hamujący występujący na wszystkich leukocytach z wyjątkiem limfocytów T i NK. W badaniu genu dla tego receptora nie znaleziono istotnych różnic, co może dowodzić, że większą rolę w sarkoidozie i gruźlicy odgrywa polimorfizm genów kodujących aktywujące receptory Fcγ. Gen *FCGR2C* dla receptorów o mniejszym znaczeniu funkcjonalnym, regulujących głównie funkcje komórek NK, także makrofagów, granulocytów obojętnochłonnych- istotne zmiany dotyczyły alleli 57X i 57 Q. Genotyp 57XX charakteryzował sarkoidozę w pierwszych stadiach i występował znacznie rzadziej w gruźlicy, gdzie przeważał układ 57XQ. Stwierdzono istotne różnice w występowaniu genotypu 57 XX i 57XQ w porównaniu do osób zdrowych: genotyp 57XX występował istotnie rzadziej zarówno w sarkoidozie, jak i w gruźlicy, zaś 57XQ istotnie częściej w obu tych chorobach, niż w grupie kontrolnej. Dalsza analiza znaczenia funkcjonalnego takich zmian wskazuje na możliwy podobny mechanizm tworzenia ziarniny zapalnej w obu tych chorobach. W tej części badania zarysowały się istotne różnice genotypowe dla poszczególnych faz sarkoidozy, co potwierdziło kolejny raz inne podłoże immunologiczne stadiów choroby. Dla genu *FCGR3A* istotne różnice dotyczyły występowania alleli 158F i 158V, przy czym genotyp 158FF przeważał w sarkoidozie i stadiach III/IV, a 158FV przeważał w gruźlicy w porównaniu do sarkoidozy. FcγRIIIB jest głównym receptorem aktywującym neutrofile. Sarkoidozę charakteryzował częściej występujący genotyp NA1/SH genu *FCGR3B* i genotyp NA2/2 w przeciwieństwie do gruźlicy, gdzie dominował NA1/NA2. Były to różnice pomiędzy chorymi na obie choroby ale i osobami zdrowymi, co mogłoby być pomocne w różnicowaniu sarkoidozy i gruźlicy. Wykazano również znaczenie różnicujące allelu SH.

Stwierdzenie obecności poszczególnych alleli i genotypów wskazuje na aktywność funkcjonalną danych receptorów w zakresie fagocytozy, immunokompleksemii i uruchomienia mechanizmów autoimmunizacyjnych. Ponadto wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na sarkoidozę lub gruźlicę. W opisie wyników przeprowadzonego badania możliwe jest przedstawienie wybranych obserwacji, niestety nie ma tu miejsca na podzielenie się niuansami, które są naprawdę

wartością i osiągnięciem tej pracy. Głęboka analiza znaczenia podłoża genetycznego funkcji receptorów Fcy prowadzi do odkrywczych wniosków, które sformułował Doktorant, nie będziemy ich powtarzać, zostały bowiem precyzyjnie wyjaśnione.

### **Ocena Rozprawy Doktorskiej, uwagi**

Rozprawa Doktorska lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego jest wynikiem żmudnej, dokładnej pracy badawczej. Badanie zostało bardzo dobrze zaplanowane. Wyróżnia je precyzyjny dobór grup badanych, co już wspomniano. Sarkoidoza, słusznie, została potraktowana jako choroba niejednorodna. Już poprzednio autorzy udowodnili, że podłoże genetyczne poszczególnych stadiów wskazuje na ich odrębność. Zastosowany kliniczny podział choroby jest historyczny, ale jakże aktualny- wpisuje się w obecne wyodrębnianie chorób śródmiąższowych w postaci z postępującym włóknieniem, co może mieć implikacje terapeutyczne związane ze stosowaniem leków antyfibrotycznych. Ale nie wybiegajmy za daleko.

Praca napisana jest bardzo dobrze, układ jest spójny, logicznie ułożony. Wyniki są przedstawione klarownie, przy tak znacznej ich liczbie łatwe do prześledzenia i zrozumienia. Oprawa graficzna, ilustracje są staranne i doskonale podkreślają osiągnięte wyniki.

Wstęp wprowadza w badane zagadnienia. Rycina 3 zasługuje na szczególną uwagę, jako ilustracja skomplikowanego zagadnienia etiopatogenezy sarkoidozy. W tabelach 5 i 6 znajdujemy wyczerpujący przegląd danych na temat podłoża genetycznego sarkoidozy i gruźlicy.

Doktorant w sposób dojrzały dokonał omówienia wyników. Badane geny biorą udział w modyfikacji różnych funkcji komórek układu odporności z różną mocą. Wytlumaczenie tych pionierskich obserwacji wymaga głębokiej znajomości tematu i umiejętnego poruszania się w trudnych zagadnieniach. Wiele obserwacji jest nowych, bez odniesienia w piśmiennictwie. Doktorant znakomicie zinterpretował te skomplikowane wyniki wykazując się znajomością plastyczności funkcji komórek układu odporności. Do własnych obserwacji podchodzi jednak ostrożnie. Dodatkowo, wyniki pracy lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego mają aspekt praktyczny. Badania genetyczne są dostępne, coraz bardziej powszechne. Wykrycie danego genotypu może być pomocne w różnicowaniu trudnych przypadków sarkoidozy i gruźlicy. Praca podkreśla również rozpatrywanie *Mycobacterium tuberculosis* jako czynnika etiologicznego sarkoidozy.

Praca pana Bartłomieja Rękawieckiego jest świetnym studium nowego zagadnienia i ma znaczenie pionierskie, jest przykładem tego, że dobra rozprawa doktorska to taka, która otwiera drzwi do dalszych badań.

Nie znajduję istotnych uchybień, jedynie drobiazgi stylistyczne. Na stronie 24 warto było zaznaczyć, że sarkoidozę charakteryzuje znaczny odsetek i liczba limfocytów w płynie z BAL.

### **Podsumowanie**

Biorąc pod uwagę wartość przedstawionej mi do recenzji pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego spełnia warunki określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021r. poz. 478 ze zm.) i wnoszę do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza medycyny Bartłomieja Rękawieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy. W uzasadnieniu pragnę zaznaczyć, że praca jest bardzo staranna, znakomicie opisana, nowatorska i oryginalna, a jej znaczenie poznawcze ma zasięg uniwersalny, międzynarodowy.

Prof. Joanna Domagała-Kulawik

