

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Michała Poznańskiego

„Nikotynizm a ekspresja i immunoekspresja pentraksyny 3 u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc”

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) należy do wąskiej grupy chorób o największym znaczeniu dla zdrowia publicznego współczesnych społeczeństw. Wynika to, przede wszystkim z jej bardzo dużego rozpowszechnienia oraz braku skutecznego leczenia, co w konsekwencji sytuuje POChP niemal na szczycie schorzeń o największej umieralności. Pomimo ogromnego wysiłku badawczego w ostatnich 20 latach w dalszym ciągu nie potrafimy odpowiedzieć na proste pytania takie jak: 1) które mechanizmy zapalenia indukowanego przez dym tytoniowy są kluczowe dla rozwoju POChP oraz 2) które markery stanu zapalnego mogą mieć znaczenie w prognozowaniu powstawania oraz w rozwoju POChP.

W swojej pracy doktorskiej lek. Michał Poznański podjął się zadania zbadania czy stosunkowo niedawno odkryte białko - pentraksyna 3 może mieć znaczenie w patogenezie POChP, czy wykazuje związek z paleniem papierosów oraz w końcu czy może być markerem stanu zapalnego u chorych na POChP. W tym celu doktorant zrekrutował byłych i aktualnych palaczy papierosów chorych na POChP oraz jako kontrolę osoby zdrowe, a następnie punktowo dokonał analizy stężeń pentraksyny 3 w osoczu krwi oraz ekspresji RNA dla pentraksyny 3 we krwi pełnej. W mojej opinii wybór tematu na pracę doktorską oraz sposobu jej realizacji zasługują na pochwałę, gdyż cele i środki doktoratu doskonale wpisują się w aktualne i nowatorskie zagadnienia dotyczące jednej z najważniejszych współczesnych chorób, która stanowi wyzwanie dla nauki światowej.

Przedstawiona mi do oceny praca liczy 90 stron tekstu, zawiera 28 rycin, 7 tabel oraz 88 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy jest typowy.

Wstęp został napisany na 12 stronach. W kolejnych podrozdziałach wstępu doktorant omawia epidemiologię, stan zapalny i leczenie przeciwzapalne w POChP. Następnie opisuje grupę białek – pentraksyny, a w tym szczególnie szczegółowo pentraksynę 3, najpierw jej ogólną charakterystykę, potem jej znaczenie w POChP oraz na końcu powiązania z dymem tytoniowym. W mojej opinii wstęp został napisany wzorcowo. Jest krótki, zwięzły, nie zawiera zbędnych dygresji, natomiast precyzyjnie prowadzi czytelnika od informacji ogólnych do szczegółowych, które są bezpośrednio związane z przedmiotem badania.

Założenia i cele badania zostały sformułowane bardzo poprawnie jako dwie główne hipotezy oraz 4 pytania badawcze. Jako ciekawą innowację traktuję zastosowanie przez autora krótkiego wprowadzenie wyjaśniającego przesłanki do sformułowanie tych właśnie założeń i celów badania. Na pochwałę zasługuje także wypunktowanie przez doktoranta aspektów nowatorskich badania.

Rozdział „Materiały i metody” został opisany poprawnie na 23 stronach. Do silnych stron tego rozdziału zaliczam szczegółową charakterystykę badanych grup, dokładny opis zastosowanych metod laboratoryjnych oraz adekwatny zestaw testów statystycznych. Z kolei do pewnych mankamentów tego rozdziału należą:

- Nietypowo nadmiernie dokładny, choć statystycznie poprawny sposób opisu rozkładu statystycznego badanych grup z powtarzającymi się opisami: „odrzucono lub nie odrzucono hipotezę zerową, etc”. Powoduję to nietypową dla prac medycznych nadmierną „rozwlekłość” tego rozdziału, kontrastującą z precyzyjnym, a przez to doskonałym wstępem.

- Liczebność badanych grup była relatywnie niska, szczególnie że materiał do badań był stosunkowo łatwo dostępny - krew, a zastosowana metodyka laboratoryjna tylko umiarkowanie skomplikowana. Autor co prawda wyjaśnia potem w dyskusji, że liczebność grup była wystarczająca do przeprowadzenia analizy, jednak grupa 6 osoba byłych palaczy z POChP jest generalnie niska.

- Pomimo deklarowanego w rozdziale „Założenia i cele badania”, że szczególny nacisk położono na „staranny dobór pacjentów do grupy badanej i kontrolnej[,] (...) dopasowanie grup nie tylko pod względem płci i wieku, (...) [oraz] dokładną weryfikację statusu nikotynizmu”, to jednak wiek chorych na POChP był znamienne wyższy niż zdrowych ochotników, w grupie POChP było więcej mężczyzn, a w grupie kontrolnej kobiet oraz zabrakło grupy osób zdrowych, którzy nigdy nie palili papierosów. Brak takiej grupy kontrolnej oraz brak informacji ile średnio w każdej z badanych grup minęło od ostatniego wypalonego papierosa, ogranicza nieco możliwości interpretacji otrzymanych wyników w kontekście wpływu palenia na stężenia i ekspresję badanego białka.

- Inne drobne uwagi do tego rozdziału: (a) w tabeli 1 (oraz w opisach rycin) bardziej poprawne byłoby użycie nazwy POChP (ewentualnie chorzy na POChP) zamiast „badani”, gdyż osoby z grupy kontrolnej też podlegały badaniu, przez co termin „badani” jest mniej precyzyjny niż POChP; (b) wiek zarówno chorych na POChP jak i grupy kontrolnej miał rozkład normalny, w związku z czym w tabeli pierwszej bardziej poprawny byłoby przedstawienie danych jako średnia i odchylenie standardowe zamiast mediany i wartości minimalnych i maksymalnych; (c) w grupie kontrolnej średnia współczynnika FEV1%FVC wynosiła 76,2% przy odchyleniu standardowym 5,17, nasuwa pytanie czy wszystkie osoby z grupy kontrolnej miały wskaźnik FEV1%FVC powyżej 70%?; (d) autor nie przedstawił dolnego progu detekcji dla pentraksyny dla metody ELISA. Brak także informacji, czy u wszystkich badanych stężenia pentraksyny były powyżej dolnego progu detekcji.

Wyniki pracy zostały przedstawione na 22 stronach, 17 rycinach oraz w 5 tabelach. Autor wykazał, że stężenia pentraksyny 3 w osoczu krwi oraz ekspresja RNA pentraksyny 3 we krwi pełnej u chorych na POChP były znamienne podwyższone w stosunku do kontroli. Ponadto doktorant stwierdził, że stężenia pentraksyny 3 w osoczu krwi były wyższe w podgrupach osób badanych aktywnie palących papierosy w porównaniu do osób które zaprzestały palenia papierosów. Ta zależność, nie dotyczyła jednak ekspresji RNA pentraksyny 3 we krwi pełnej. Dodatkowo doktorant zaobserwował szereg interesujących korelacji, z których najciekawszą wydaje się dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami pentraksyny 3 a wskaźnikiem wypalonych papierosów mierzonym za pomocą paczkołat.

Rozdział „Dyskusja” liczy tylko 6 stron, ale podobnie jak „wstęp” należy do najmocniejszych punktów pracy doktorskiej. Na moje wysokie uznanie zasługuje wysoce poprawna konstrukcja tego rozdziału. Autor zgodnie z klasycznymi zasadami tego rozdziału dokonuje tylko krytycznej analizy otrzymanych wyników w oparciu o dostępną i bardzo aktualną literaturę oraz starając się samemu dokonać krytycznej analizy wyników swojej pracy oraz danych literaturowych. Na koniec rozdziału autor omawia także potencjalne mankamenty pracy, z których moim zdaniem najważniejszym jest stosunkowa niska liczebność badanych grup. Ta analiza zasługuje zatem na najwyższą pochwałę. Pomimo mojej jednoznacznie pozytywnej oceny rozdziału „Dyskusja”, którym doktorant potwierdził swoją wysoką dojrzałość badawczą, chciałbym wskazać, że w wielu miejscach tego rozdziału nie zgadzam się z interpretacją autora. Jednocześnie pragnę zauważyć, że rozbieżności interpretacyjne w żadnym stopniu nie wpływają na moją wysoką ocenę tej pracy doktorskiej. Jako przykład mojego innego spojrzenia na otrzymane wyniki, przytoczę wyjaśnienia autora na stronach 68 i 69, dlaczego ekspresja RNA pentraksyny 3 we krwi pełnej osób, które aktualnie paliły w porównaniu do byłych palaczy nie była podwyższona analogicznie do stężeń pentraksyny 3 w osoczu krwi. Według doktoranta brak różnic u

chorych na POChP o różnym statusie palenia „nie dziwi” go, gdyż jak pisze „w grupie chorych na POChP – tu jak wiemy proces zapalny trwa cały czas”. Z kolei „w przypadku pacjentów z grupy kontrolnej. Logiczne wytłumaczenie takiej obserwacji wydaje mi się wynikać z wieku pacjentów, a przez to z ich współchorobowości” konkluduje doktorant. Moim zdaniem istnieje prostsze i znacznie bardziej prawdopodobne wytłumaczenie obserwowanych różnic. Wynika ona z faktu, że RNA generalnie znajduje się w komórkach a nie w osoczu krwi. Zatem oznaczenie ekspresji RNA pentraksyny 3 we krwi tak naprawdę odzwierciedla zmiany w komórkach krwi podczas gdy oczywiście za pomocą metody ELISA badamy stężenie białek, a w tym pentraksyny 3 w osoczu. Źródłem pentraksyny 3 jak sam pisze doktorant we wstępie mogą być „makrofagi, komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, komórki śródbłonna, fibroblasty i adipocyty, w miejscu, w którym toczy się proces zapalny”, a więc przede wszystkim komórki inne niż komórki krwi. A zatem prawidłowa interpretacja otrzymanych przez doktoranta wyników, powinna być następująca: obciążenie paleniem papierosów prawdopodobnie nie ma związku z produkcją pentraksyny 3 przez komórki krwi, natomiast prawdopodobnie wpływa na komórki „tkankowe” w miejscu toczącego się zapalenia, a więc w tkance płucnej.

W kolejnym podrozdziale doktorant przedstawia 6 wniosków, które wyciąga na podstawie otrzymanych wyników badania oraz odniesienia ich do danych literaturowych. Niestety niektóre z wniosków są moim zdaniem niewystarczająco uzasadnione. Szczególnie dotyczy to wniosków 3 i 5. We wniosku 3 doktorant pisze „Zaprzestanie palenia tytoniu prowadzi do redukcji zapalenia mierzonego spadkiem stężenia pentraksyny 3.” Większość znanych mi prac dotyczących zapalenia w POChP wykazywało, że po zaprzestaniu palenia papierosów u chorych na POChP stan zapalny utrzymuje się nadal i z reguły nie stwierdzano różnic pomiędzy chorymi na POChP którzy palili i zaprzestali palić. Stwierdzone przez doktoranta różnice są tak ciekawe, gdyż odbiegają od tej generalnej

zasady. Moim zdaniem brak jednak wystarczających danych do sformułowania wniosku 3 w jego aktualnej formie, tzn. że zaprzestanie palenia papierosów prowadzi do redukcji zapalenia oraz że miarą zapalenia w POChP są stężenie pentraksyny 3 – to ostatnie wymagałoby potwierdzenia w co najmniej kilku badaniach, że pentraksyna 3 jest takim markerem. Podobnie absolutnie brak jest dowodów na wniosek 5 „Przeciwwzpalny wpływ pentraksyny 3 nie jest wystarczający do zatrzymania rozwoju POChP”. Oczywiście, hipoteza że jakiegokolwiek pojedyncze białko, a więc i pentraksyna 3, prawdopodobnie nie będzie miało odpowiednio dużej siły przeciwwzpalnej aby zatrzymać zapalenie w POChP jest bardzo prawdopodobne, jednak nie jest to wniosek mający oparcie w pracy doktoranta.

Streszczenie zawiera syntezę najważniejszych danych z pracy doktorskiej. Piśmiennictwo zostało dobrane bardzo poprawnie. Zawiera najważniejsze prace z omawianego obszaru badawczego, w tym wiele prac najnowszych z lat 2014-2016.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska lek. Michała Poznańskiego wnosi oryginalny i samodzielny wkład do badań nad mechanizmami stanu zapalnego w POChP. Podjęcie tak istotnej tematyki, bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, jej szeroki zakres tematyczny, doskonała umiejętność posługiwania się warsztatem naukowym upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana dysertacja spełnia warunki wymagane do ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych. Na tej podstawie mam zaszczyt zwrócić się do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. Michała Poznańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie jego pracy.

Z poważaniem

dr hab. n. med. Adam Barczyk

