

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Anny Witkowskiej

p.t. „*Ocena dynamiki zmian stężeń interleukiny IL-37, interleukiny IL-23 i interleukiny IL-33 u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym*”

wykonanej w Klinice Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: **Prof. dr hab. nauk med. Marlena Broncel**

Promotor pomocniczy: **dr nauk med. Paulina Gorzelak-Pabiś**

Odpowiedź zapalna podczas i po ostrym zawale serca wydaje się odgrywać kluczową rolę w okresie około zawałowym, związanym z uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym, niekorzystną przebudową serca, wielkością zawału i złym rokowaniem. Dotychczasowe dane potwierdzają, że podwyższone poziomy cytokin prozapalnych są związane z wysoką śmiertelnością i zachorowalnością. Wręcz przeciwnie, istnieją dowody na to, że przeciwzapalne cytokiny mogą tłumić odpowiedź zapalną wywołaną przez zawał i są skorelowane z lepszym rokowaniem. Najistotniejszym wydaje się jednak brak równowagi cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych co może skutkować najgorszym rokowaniem. Włączenie tych biomarkerów stanu zapalnego do ustalonych modeli prognostycznych może jeszcze bardziej poprawić zarówno ich moc prognostyczną, jak i skuteczne leczenie pacjentów. W świetle dostępnej ale niepełnej wciąż wiedzy, temat podjęty przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle interesujący, ważny i bardzo aktualny. Swą dysertację doktorską Autorka poświęciła dwóm, o całkowicie odmiennym działaniu cytokinom: IL-37 i IL-23. Podczas stanu zapalnego IL-37 hamuje ekspresję cytokin prozapalnych na rzecz ekspresji przeciwzapalnych. Interleukina-23 jest natomiast cytokiną prozapalną, która bierze udział w różnicowaniu komórek Th17 w kontekście prozapalnym. Nie było to jedyne zainteresowanie Doktorantki. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt zwrócenia uwagi na kontrowersyjną interleukinę-33 (IL-33). Interleukina-33 jest cytokiną obecną w większości komórek serca i jest wydzielana podczas martwicy, gdzie działa jako funkcjonalny ligand dla receptora ST2.

Chociaż oś IL-33/ST2 chroni przed różnymi formami chorób sercowo-naczyniowych, niektóre badania sugerują potencjalne, szkodliwe role sygnalizacji IL-33. W modelu zawału serca u myszek wykazano, że podawanie IL-33 chociaż jest związane z fenotypem naprawczym po zawale, to pogarsza jednak przebudowę serca i sprzyja jego niewydolności. Ważnym elementem rozprawy są również badania dotyczące rozpuszczalnego receptora ST2 (sST2), powstającego na drodze alternatywnego splicingu pre-mRNA tego receptora. sST2 pełni funkcję „przynęty”, zmiatacza IL-33 regulując tym samym jej dostępność do właściwego, związanego z błoną receptora ST2.

Tytuł, jak i cel rozprawy jest sformułowany bardzo ambitnie, chociaż Autorka wcale nie określiła dynamiki zmian stężenia i ekspresji genów badanych cytokin, albowiem dokonała oznaczenia jedynie w dwóch punktach czasowych:

- 1). w momencie prezentacji pacjenta (jeszcze przed interwencją wieńcową) oraz
- 2). po trzech miesiącach od wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego.

Takie postępowanie badawcze pozwala tylko na określenie zakresu zmian i ich kierunku. Ocena dynamiki zmian wymaga wykonywania przynajmniej kilku oznaczeń, pozwalając uwidocznić moment pojawienia się zmian po OZW i dalej z jaką szybkością przebiegają. Jest to jednak jedynie uwaga edytorska, bowiem dobrze zaplanowana sekwencja badań i przedstawione w rozprawie wyniki świadczą o wyraźnym dążeniu Autorki do weryfikacji hipotezy, że indukowany ostrym zespołem wieńcowym stan zapalny ma charakter dynamiczny i prawdopodobnie będzie ulegał obniżeniu. Jednocześnie wykonane badania mogą w pełni zaspokoić naukową ciekawość Doktorantki, która postawiła przed sobą jakże ważne pytanie: *czy wystąpią różnice w przebiegu stanu zapalnego u pacjentów z zawałem STEMI w porównaniu do pacjentów z NSTEMI + niestabilna choroba wieńcowa?*

Rozprawa ma typowy układ pracy doktorskiej. Zachowano prawidłowe proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. We wstępie Doktorantka przedstawiła epidemiologię i patogenezę ostrych zespołów wieńcowych oraz szczegółowo opisała strukturę i funkcję badanych cytokin. Wstęp doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia, z którymi zmagala się Doktorantka w swej rozprawie. Stosunkowo nieliczną grupę badaną (40 pacjentów) Autorka podzieliła na dwie podgrupy: 1). stanowili pacjenci z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST

(n = 18) oraz 2). pacjenci z zawałem serca bez uniesienia odcinka ST + z niestabilną dławicą piersiową (n = 22). Pełną charakterystykę demograficzną, kliniczną i biochemiczną zakwalifikowanych pacjentów przedstawiono w rozdziale wyniki. Autorka zwraca uwagę, że pacjenci z STEMI charakteryzowali się młodszym wiekiem, częściej byli aktywnymi

palaczami nikotyny oraz rzadziej chorowali na choroby przewlekłe w porównaniu do grupy NSTEMI + UA. Warto również zwrócić uwagę, że stosowane w pracy doktorskiej metody badawcze są nowoczesne i zapewniają otrzymanie rzetelnych wyników. Zostały opisane w najdrobniejszych szczegółach co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej. Warto w tym miejscu dodać, że poza oznaczeniami stężenia - zostały wykonane badania transkryptomyczne ekspresji mRNA odpowiednich interleukin. Tak więc, Autorka oceniała cały szlak ekspresji: od transkrypcji DNA do białka.

Wyniki badań przedstawiono w formie ośmiu czytelnych tabel i dziesięciu rycin. Uzyskane wyniki wyraźnie pokazują, że stężenie IL-33 w surowicy w momencie ACS jest istotnie wyższe u pacjentów z STEMI ($p < 0.0005$) w porównaniu z NSTEMI+UA. Natomiast mediana poziomu sST2 w grupie STEMI w momencie ACS jest nieistotnie wyższa niż u pozostałych pacjentów. Ponadto po analizie krzywej ROC, Autorka sugeruje, że podwyższone stężenie IL-33 w surowicy w momencie ACS jest dodatnim predyktorem wystąpienia STEMI z wartością odcięcia wynoszącą 118.36 pg/ml (AUC 0.826, $p < 0.001$). Sugestia ta wydaje się być dyskusyjna, bowiem oznaczenia były wykonywane *post factum* po pełnej diagnostyce i przed interwencją wieńcową. Uzyskane dane wskazują, że stężenie IL-33 efektywnie różnicuje pacjentów z STEMI i NSTEMI+UA. Wyższe stężenia IL-33 u pacjentów z STEMI obrazują zależność pomiędzy bodźcem a ekspresją alarmującej cytokiny. Jednocześnie, stężenie sST2 nie różniło się istotnie w obu grupach, co może świadczyć o względnym braku tłumienia sygnału alarmowego indukowanego wiązaniem IL-33 z błonowym receptorem ST2. W przeciwieństwie do IL-33, obserwowane w momencie ACS stężenia pozostałych badanych cytokin (IL-37 i IL-23) nie różniły się u pacjentów z STEMI i NSTEMI+UA ($p > 0.05$). W badaniach po 3 miesiącach od ACS zaobserwowano istotny spadek stężenia IL-33 w surowicy w grupie pacjentów z STEMI ($p < 0.007$), podczas gdy nie było istotnych różnic w grupie wszystkich pacjentów z NSTEMI+UA. Stężenie sST2 w grupie STEMI nie uległo istotnemu obniżeniu po 3 miesiącach od ACS, gdy tymczasem w grupie pacjentów z NSTEMI+UA wykazano istotny spadek stężenia sST2. Godnym uwagi jest spostrzeżenie, że stężenie sST2 po 3 miesiącach było istotnie wyższe w grupie STEMI w porównaniu do NSTEMI+UA ($p < 0.028$). Nie udało się wykazać ekspresji mRNA IL-33 w PBMCs. Autorka słusznie sugeruje, że IL-33 ulega ekspresji w miejscu zapalenia, bez obwodowej reakcji jednojądrzastych komórek krwi. Wyższe wartości stężenia sST2 utrzymujące się w obserwacji 3-miesięcznej w grupie STEMI mogą wg Doktorantki świadczyć o silniejszej, długotrwałej reakcji zapalnej u pacjentów z STEMI. Z drugiej strony, stężenie sST2 pozostające na wysokim poziomie może świadczyć o występowaniu naturalnej

ochronnej reakcji polegającej na ograniczeniu biodostępności IL-33, która chociaż jest związana z fenotypem naprawczym po zawale, pogarsza jednak przebudowę serca i sprzyja niewydolności serca. Mam nadzieję na dyskusję dotyczącą: *roli wykazanych zmian stężenia IL-33 oraz sST2 w 3-miesięcznej obserwacji po STEMI.*

W swej pracy Autorka przedstawiła ciekawe i niezwykle ważne wyniki dotyczące przeciwwzapalnej cytokiny IL-37. Wykazała bowiem, że u pacjentów z STEMI następuje istotny wzrost poziomu IL-37 a także ekspresji jej mRNA w PBMC po 3 miesiącach od ACS, co jak słusznie zauważa może być związane z silniejszą odpowiedzią przeciwwzapalną angażującą

IL-37. Odwrotnie, w grupie pacjentów z NSTEMI+UA dochodzi do znamienego spadku stężenia IL-37 przy niezmienionej ekspresji mRNA. Nieco inaczej zachowywała się prozapalna IL-23. W przypadku tej cytokiny nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy jej stężeniem w surowicy pomiędzy grupami ACS. Nie zaobserwowano również zmian stężenia IL-23 w surowicy po 3 miesiącach. Poziom ekspresji mRNA IL-23 po 3 miesiącach był nieistotnie wyższy u pacjentów z STEMI.


Rozprawę wieńczy obszerna i bardzo ciekawa dyskusja, w której Doktorantka wykazała się wręcz znakomitą znajomością literatury przedmiotu badań a także krytyczną oceną uzyskanych wyników. Główną osią dyskusji jest przedstawienie uzyskanych wyników na tle badań innych autorów. Przedstawia również szereg badań klinicznych dotyczących roli czynników zapalnych w ryzyku rezydualnym choroby niedokrwiennej serca. Konkludując wyniki tych badań wyrażają nadzieję - stwarzają one możliwości obniżania ryzyka sercowo-naczyniowego poprzez ingerencję w immunologiczne mechanizmy zapalne. Zastosowanie leków immunomodulujących może stać się w przyszłości skuteczną profilaktyką pierwotną, jak i wtórną chorób sercowo-naczyniowych, będących skutkiem klinicznych powikłań miażdżycy.

Kończące rozprawę wnioski przedstawione w siedmiu punktach są bardzo ostrożne i znajdują potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań. Brak mi jednak, choć próby sformułowania bardziej ogólnej refleksji o klinicznym znaczeniu obserwowanych zmian. Chciałabym poznać opinię Autorki o charakterze tych zmian: *czy są one pozytywne czy negatywne, i czy poprawiają czy pogarszają rokowanie pacjentów?*

Reasumując uważam, że rozprawa Pani Anny Witkowskiej zawiera znaczące elementy nowości naukowej. Jak słusznie pisze Doktorantka uzyskane wyniki „należy traktować jako generowanie hipotez, które niosą za sobą potrzebę dalszych badań”. Praca badawcza jest nie tylko szukaniem odpowiedzi, ale także stawianiem pytań. Oba te zadania spełnia rozprawa

Pani Anny Witkowskiej i wypełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Przedstawione wyniki wnoszą znaczący wkład w zrozumienie nie tylko roli procesów zapalnych w patogenezie ostrych zespołów wieńcowych, ale przede wszystkim pozwalają na wgląd w ich przebieg we wczesnym okresie pozawałowym.

Uważam, że dysertacja doktorska lek. med. Anny Witkowskiej w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Mam zaszczyt i przyjemność zawrócić się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. med. Anny Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy i nowatorski charakter wyników badań, wnoszę o jej wyróżnienie.

WARSZAWSKI
UNIWERSYTET MEDYCZNY
Wydział Farmaceutyczny

prof. dr hab. Grażyna Sygitowicz