

Warszawa, 2018-05-08

Dr hab. n. med. Jacek Nowak  
Specjalista w dziedzinach:  
Laboratoryjna hematologia medyczna,  
Europejska specjalizacja w zakresie immunogenetyki  
i immunologii transplantacyjnej (ESHI),  
Analityka kliniczna, diagnostyka laboratoryjna  
Profesor nadzwyczajny w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii  
Kierownik Zakładu Immunogenetyki  
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

**Ocena manuskryptu Rozprawy Doktorskiej magister Mileny Iwaszko  
w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora**

Dziękując Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk za przedstawienie mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Mileny Iwaszko pt. „Rola polimorfizmu receptorów z rodziny CD94/NKG2 oraz cząsteczki HLA-E w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów” stwierdzam, co następuje:

Rozprawa doktorska mgr Mileny Iwaszko została przygotowana pod opieką promotora, Prof. dr hab. Katarzyny Boguni-Kubik i promotora pomocniczego, Dr inż. Agnieszki Chrobak.

Przed rozpoczęciem lektury dzieła zwraca uwagę fakt publikacji cząstkowych wyników badań mgr Mileny Iwaszko w szeregu ważnych pod względem wpływu czasopism naukowych, w tym indeksowanych na Liście Filadelfijskiej (bazy Institute for Scientific Information) i posiadających przypisany im współczynnik oddziaływania –Impact Factor (*Joint Bone Spine, Clinical and Experimental Immunology, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*) oraz czasopism wymienionych na liście Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (*Genes, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*). Podkreśla to wagę podejmowanych zagadnień. W pracach tych mgr Milena Iwaszko występuje jako pierwszy autor, co wskazuje, że przedstawiona praca zbiorcza jest oryginalnym dorobkiem doktorantki.

Przedstawiony do recenzji manuskrypt zawiera 203 strony maszynopisu. Treść podzielono na 11 precyzyjnie rozplanowanych rozdziałów obejmujących zarówno rozdziały wymagane standardowo jak i podrozdziały przedstawiające klarowną klasyfikację treści oraz ułatwiające lekturę. Praca obejmuje 83 tabele, 37 rycin oraz 325 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Spis treści nie obejmuje wykazu tabel i rycin. Streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera krótki zarys znaczenia komórek T i NK oraz ich receptorów w reumatoidalnym zapaleniu stawów, prezentuje cele pracy, liczebność i pochodzenie grup badanych i kontrolnych, wyszczególnia użyte metody i podaje sposób przeprowadzenia analiz, przedstawia otrzymane wyniki i ich istotność wraz ze wskazaniem potencjalnej roli badanych polimorfizmów i ekspresji cząsteczek z rodziny CD94/NKG2 i HLA-E w rozwoju RZS i odpowiedzi na leczenie z zastosowaniem inhibitorów TNF.

Wstęp zawiera najistotniejsze informacje dotyczące definicji, epidemiologii, etiologii i patogenez, obrazu i klinicznego przebiegu RZS oraz czynników środowiskowych i genetycznych sprzyjających chorobie. Ważną część Wstępu stanowi opis diagnostyki laboratoryjnej i obrazowej RZS, która daje podstawę prawidłowej klasyfikacji rozpoznania i stopnia zaawansowania RZS. Przyjęto współczesne kryteria ACR/EULAR 2010, a dla oceny aktywności choroby przyjęto wskaźnik DAS28, dzięki czemu zapewniono wysoką wiarygodność dokonywanych następnie analiz, gdyż precyzyjne określenie rozpoznania oraz stopnia zaawansowania jest istotnym czynnikiem wiarygodności badań naukowych nad zapadalnością i leczeniem chorób. Doktorantka omówiła również postępy w leczeniu RZS z uwzględnieniem metod konwencjonalnych i najnowszych metod biologicznych, w tym panelu leczniczego inhibitorów TNF. W części Wstępu poświęconej budowie i funkcji receptorów: CD94/NKG2, (NKG2D)<sub>2</sub> oraz ich ligandów: HLA-E, MICA, MICB i ULBP doktorantka precyzyjnie przeanalizowała najnowsze piśmiennictwo na ten temat znajdując wiele odniesień do schorzeń autoimmunologicznych i RZS. Przywołała między innymi wyniki badań na modelu mysim RZS (collagen induced arthritis, CIA), wskazujące na istotną rolę szlaków sygnałowych receptora NKG2D. Fakt ten umiejętnie powiązała z obecnością nietypowych, potencjalnie autoreaktywnych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> z nadekspresją NKG2D w krwi osób chorych na RZS oraz nadekspresją ligandów MICA/MICB i podwyższonym poziomem cytokin w obrębie zmienionych chorobowo stawów w RZS. Przeprowadzona krytyczna analiza piśmiennictwa w

przytoczonym powyżej zakresie (i innych aspektach związanych z tematem pracy) pozwoliła na mocne uzasadnienie podjęcia badań w zakresie określonym w tytule rozprawy doktorskiej.

Cel pracy został sformułowany jasno i klarownie, a było nim poszukiwanie wpływu wybranych polimorfizmów receptorów rodziny CD94, NKG2 i ich ligandów HLA-E na predyspozycję do zachorowania na RZS, ich związku z klinicznymi i laboratoryjnymi parametrami aktywności RZS i skutecznością nowoczesnego leczenia inhibitorami TNF. Badano również związek ekspresji białek z rodziny NKG2 i HLA-E z zachorowaniem na RZS.

Rozdział Materiał i Metody zawiera wyczerpujące informacje niezbędne do oceny wiarygodności otrzymanych wyników badań oraz do ewentualnej replikacji badań na odrębnej grupie badanej. Grupa badana w zakresie polimorfizmu wybranych genów liczyła N=303 pacjentów, a grupa badana w zakresie komórkowej ekspresji wybranych białek liczyła N=34 chorych. Chorzy obu grup byli dokładnie monitorowani i prawidłowo opisani w zakresie kryteriów kwalifikacji do badań, czynników dyskwalifikujących, warunków zakwalifikowania do terapii biologicznej, schematu dawkowania inhibitorów TNF, badań laboratoryjnych i charakterystyki pacjentów. Większość osób badanych stanowiły kobiety (78-80%) o średniej wieku, odpowiednio 52 i 61 lat. Grupa kontrolna w zakresie polimorfizmu liczyła N=238 osób prawidłowo dobranych wiekowo, lecz większość w niej stanowili mężczyźni (55%). Natomiast grupa kontrolna w zakresie ekspresji liczyła N=24 osoby była prawidłowo dobrana w zakresie płci (75% kobiet). Ich średnia wieku nie została podana, lecz mogła być niższa (obejmowała czynnych krwiodawców) niż średnia wieku osób badanych w zakresie ekspresji białek komórkowych (61 lat). Rozbieżności charakterystyki grupy badanej i kontrolnej, zwłaszcza w zakresie płci powinny być uwzględnione w modelowaniu analiz statystycznych.

Jak wspomniano wybór genów poddanych analizom polimorfizmu był głęboko uzasadniony w dostępnym piśmiennictwie. Zestaw badanych polimorfizmów tych genów jest również niezwykle ciekawy i ma głębokie uzasadnienie w ich sugerowanym w literaturze związku z ryzykiem zachorowania na choroby autoimmunologiczne i/lub nowotworowe. W wyborze polimorfizmów posłużono się wiarygodnymi bazami danych: PubMed, dbSNP NCBI, SNPinfo Web Server, HapMap oraz 1000 Genomes Project.

Na podkreślenie zasługuje użycie zaawansowanej metodyki badań genetycznych i cytometrycznych, których szczegółowy opis przedstawiono w rozdziale Materiał i Metody. W szczególności, w analizie genetycznej badano genomowe DNA przy użyciu sond typu TaqMan,

zestawów TaqMan SNP Genotyping Assay i aparatu 7300 Real-Time PCR System. Polimorfizmy niektórych genów oznaczano z zastosowaniem zestawów LightSNiP. Cytometryczną analizę ekspresji białek na powierzchni różnych subpopulacji komórek NK, NKT i T prowadzono przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej przy użyciu 6 kolorowego cytometru przepływowego FACSCanto z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych o 14 specyficznościach i 7 kontroli izotypowych, znakowanych APC, Pe, FITC lub PE-Cy7. Ogólnie dla każdej osoby badanej wykonywano barwienia w 23 czterokolorowych kombinacjach, z uwzględnieniem wiarygodnych barwień kontrolnych. Metodyka świadczy o zaawansowaniu technicznym doktorantki.

Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci wielowariantowych zestawień tabelarycznych i poddano wiarygodnej analizie statystycznej. W związku ze wskazaną wcześniej niejednorodnością grupy badanej i kontrolnej w uzasadnionych przypadkach wyniki przedstawiano z podziałem na kobiety i mężczyzn w odniesieniu do grupy kontrolnej tej samej płci. Trafność wyboru badanych polimorfizmów genetycznych potwierdziły otrzymane wyniki. Zaobserwowano istotny statystycznie związek trzech polimorfizmów genetycznych z podatnością na RZS: *CD94 rs2302489*, *HLA-E rs1264457* i *NKG2D rs1049174* oraz a dla siedmiu polimorfizmów wykazano związek z odpowiedzią na leczenie anty-TNF: trzy powyższe oraz *NKG2A rs7301582* i *rs2734440*, *HLA-E rs1059510* oraz *NKG2D rs2255336*. Bardzo ciekawym spostrzeżeniem doktorantki była zwiększona (niekiedy bardzo silnie zwiększona) ekspresja NKG2D na powierzchni wszystkich badanych typów komórek, zarówno NK, NKT, jak i T.

Omówienie wyników zostało w dysertacji przeprowadzone bardzo ostrożnie, rzekłbym ascetycznie, ograniczając się do dokładnego przedstawienia stwierdzonych, istotnych statystycznie różnic lub ich braku pomiędzy grupą badaną a grupami odniesienia. Przedstawiono równocześnie szeroki zarys piśmiennictwa w zakresie chorób autoimmunologicznych i nowotworowych, w których autorzy stwierdzili podobne różnice, ale także wyniki przeciwstawne lub brak jakichkolwiek różnic. W dyskusji zabrakło krytycznego odniesienia się do niektórych zmiennych, jak np. faza choroby, w której przeprowadzono badania. Doktorantka zajmowała się grupą, w której osoby badane przeszły kilka cykli leczenia standardowego, zresztą nieskutecznego. Można więc uznać, że wszyscy pacjenci byli w późnej fazie choroby, niezależnie od stopnia jej zaawansowania. Rozbieżne wyniki badań przedstawione przez innych autorów mogły wynikać z faktu ich wykonania w momencie rozpoznania lub krótko po nim.

Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników doktorantka przedstawiła ostrożne wnioski, w pełni adekwatne do współczesnych możliwości i ograniczeń metodologii naukowej, które można streścić następująco:

1. Polimorfizm *CD94* rs2302489 może wpływać na ryzyko zachorowania na RZS, skuteczność leczenia inhibitorami TNF- $\alpha$  oraz obecność przeciwciał anty-CCP u chorych na RZS.
2. Warianty polimorficzne w obrębie genu *NKG2A*: rs7301582 oraz rs2734440 mogą być związane z podatnością na zachorowanie na RZS oraz pełnić rolę w warunkowaniu odpowiedzi na terapię anty-TNF- $\alpha$ .
3. Polimorfizmy *HLA-E* rs1264457 oraz *HLA-E* rs1059510 mogą stanowić czynniki ryzyka rozwoju RZS u kobiet oraz wpływać na odpowiedź na leczenie inhibitorami TNF- $\alpha$  u pacjentek chorych na RZS.
4. Polimorfizmy w obrębie genu *NKG2D*: rs2255336 oraz rs1049174 mogą odgrywać rolę w warunkowaniu odpowiedzi na terapię z zastosowaniem leków blokujących działanie TNF- $\alpha$ .
5. Warianty polimorficzne *NKG2A* rs2734414 oraz *NKG2D* rs1154831 nie są czynnikami predysponującymi do rozwoju RZS, jak również nie wywierają wpływu na efekt terapeutyczny stosowania inhibitorów TNF- $\alpha$ .
6. Zaobserwowany podczas analiz cytometrycznych istotnie podwyższony odsetek komórek *NKG2D* w obrębie populacji NK, T, NKT może wskazywać na udział szlaku sygnałowego *NKG2D-MICA/B* w patogenezie RZS.
7. Badanie licznosci subpopulacji limfocytów T  $\gamma\delta$  wykazało istotnie wyższy odsetek komórek T  $\gamma\delta 2$  u chorych na RZS, co może wskazywać na udział limfocytów T  $\gamma\delta 2$  w patogenezie RZS.
8. Zaobserwowany podczas analiz cytometrycznych podwyższony odsetek limfocytów T  $\gamma\delta 1$  oraz T  $\gamma\delta 2$  wykazujących ekspresję receptora *NKG2D* u chorych na RZS może sugerować, że nadmierna aktywność receptora *NKG2D* na subpopulacji limfocytów T  $\gamma\delta$  może przyczyniać się do rozwoju RZS.

Podsumowując, przedstawiona dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w zakresie biologii i medycyny. Praca dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia przez doktorantkę pracy naukowej zaawansowanymi technikami oraz zdolności koordynacji pracy szerokiego zespołu badawczego. Monografia spełnia kryteria stawiane rozprawie, które są wymagane przy ubieganiu

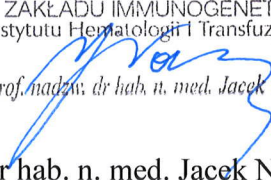
się o stopień doktora, i które wynikają z art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (tekst jednolity, Dz.U. 2017 r., poz. 1789).

W oparciu o przedstawioną opinię, wyrażam przekonanie, że przedstawiona przez Panią mgr Milenę Iwaszko rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe i może stać się podstawą nadania Jej stopnia naukowego doktora, o co wnoszę.

W związku z wysoką wartością merytoryczną i wzorową formą rozprawy, na podstawie punktu 1 „Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich” obowiązującego w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Mgr Mileny Iwaszko.

Recenzent

K I E R O W N I K  
ZAKŁADU IMMUNOGENETYKI  
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

  
Prof. nadzw. dr hab. n. med. Jacek Nowak

Dr hab. n. med. Jacek Nowak