



UMDI:

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSYPLIN NAUKI MEDYCZNE  
Fizjoterapeuci

04-04-2024

prof. dr hab. Agnieszka Hałoń

**RECENZJA**

Łódź 03.04.2024 r.

**rozprawy doktorskiej lekarz Agnieszki Kopeć „Stężenie tryptazy, markera aktywności mastocyta, w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc”**

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) należy obok astmy oskrzelowej do grupy chorób obturacyjnych układu oddechowego, które stanowią istotne obciążenie dla pacjentów, ich rodzin i systemu opieki zdrowotnej. Biorąc pod uwagę wyniki badań epidemiologicznych, częstość występowania POChP w Polsce szacuje się na około 10% populacji po 40 roku życia. Obraz choroby wiąże się z pogorszeniem tolerancji wysiłku, częstymi zaostrzeniami, potrzebą systematycznego stosowania leków, a niekiedy w przypadku niewydolności oddechowej, koniecznością zastosowania tlenoterapii domowej. Najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju POChP w Polsce jest bez wątpienia palenie tytoniu, a brak skutecznych działań w zakresie zdrowia publicznego, w tym programów walki z nałogiem, skutkuje utrzymywaniem się niekorzystnych trendów epidemiologicznych. Celem terapii POChP jest redukcja nasilenia objawów, w tym w szczególności duszności, poprawa tolerancji wysiłku i zmniejszenie liczby zaostrzeń choroby. Warto podkreślić, że zmiany w układzie oddechowym wywołane dymem tytoniowym są w praktyce nieodwracalne, a podstawą walki z POChP jest prewencja pierwotna, rzucenie nałogu palenia oraz utrzymanie optymalnej wydolności układu oddechowego. W praktyce POChP jest chorobą przewlekłą, nieuleczalną a w obrazie klinicznym często obserwuje się stopniową progresję objawów. Biorąc pod uwagę kluczowy czynnik etiologiczny – palenie tytoniu, charakterystyczne jest również współistnienie chorób takich jak choroby układu krążenia, rak płuca, nadciśnienie tętnicze, osteoporoza, zaburzenia stanu odżywienia, osłabienie mięśni, kacheksja, zaburzenia lipidowe i wiele innych. Poznanie mechanizmów związanych z rozwojem POChP jest kluczem do wdrożenia skutecznych metod diagnostyki i terapii. Stąd wybór tematu badań doktorantki – ocena funkcji mastocytów w POChP ma istotne znaczenie z punktu widzenia wiedzy medycznej.

Rozprawa doktorska lekarz Agnieszki Kopeć pt. „Stężenie tryptazy, markera aktywności mastocyta, w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc” składa się z 88 stron maszynopisu, zawiera 9 tabel, 12 rycin i 178 pozycji dobrze dobranej literatury. Praca napisana jest

w sposób przejrzysty, poprawnym językiem co ułatwia zapoznanie się z materiałem badawczym, a liczne ryciny i tabele potęgują walor edukacyjny opracowania. Praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. Składa się z następujących rozdziałów: wstępu, celu pracy, materiału i metodyki, wyników, ich omówienia w dyskusji, opisu ograniczeń pracy, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwa.

We wstępie szeroko omówiono podstawowe zagadnienia związane z komórkami tucznyymi (mastocytami, MC), w tym przedstawiono ich morfologię i dojrzewanie, mechanizmy zasiedlania tkanek, lokalizację tkankową, receptory, zasady aktywacji i multipotencjalnego działania. Dotychczasowe badania pozwoliły na ustalenie istotnej roli MC w takich procesach fizjologicznych jak mechanizmy obrony przeciw drobnoustrojom (bakteriom, wirusom, pasożytom), regeneracji tkanek, prokreacji, utrzymania homeostazy nabłonków czy funkcji regulacyjnych odporności swoistej i nieswoistej. Obecnie nie ma wątpliwości, że reakcje immunologiczne, w których biorą udział MC, mogą prowadzić do amplifikacji procesu zapalnego, remodelingu tkanek i rozwoju przewlekłego zapalenia, leżącego u podłoża wielu chorób, w tym chorób obturacyjnych układu oddechowego. Więcej miejsca poświęcono omówieniu tryptazy, która stanowi najliczniejszą grupę białek wytwarzanych przez komórki tuczne a jej stężenie uznawane jest za marker aktywacji, który ponadto odzwierciedla całkowitą pulę komórek tucznych w organizmie. Warto podkreślić, że tryptaza jest silnym czynnikiem wzrostu dla fibroblastów, komórek śródbłonna i miocytów, stąd może odgrywać znaczenie w patomechanizmach POChP. W odrębnym rozdziale Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z POChP, w tym epidemiologię, definicję i procesy leżące u podłoża rozwoju tej jednostki chorobowej. Szczególną uwagę zwrócono na nowe odkrycia m. in. komórek supresorowych pochodzenia szpikowego (MDSCs) oraz komórek wydzielniczych układu oddechowego (RASCs). Doktorantka podsumowała, że pomimo ugruntowanej wiedzy na temat patomechanizmów POChP cały czas pojawiają się nowe doniesienia naukowe poszerzające nasze rozumienie omawianych zjawisk.

Ciekawe, zdaniem recenzenta, jest przedstawienie potencjalnej roli mastocyta w POChP. Pomimo strategicznej lokalizacji w układzie oddechowym i uwalnianiu przez te komórki szeregu mediatorów wpływających na zapalenie, przebudowę dróg oddechowych, włóknienie i angiogenezę, wydaje się, że ich znaczenie w patomechanizmach POChP było dotychczas niedoceniane. Doświadczenia *in vitro* i w modelach zwierzęcych wykazały indukowany przez mastocyty napływ neutrofilów do dróg oddechowych. W modelach ekspozycji zwierząt na dym papierosowy obserwując typowy obraz histopatologiczny POChP, potwierdzono wzrost liczby



komórek tucznych i zwiększenie ekspresji szeregu cytokin prozapalnych. Kromoglikan sodu, stabilizator mastocytów, zmniejszał naciek zapalny, w tym liczbę komórek tucznych. Dotychczas opublikowane wyniki badań *in vivo* nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Niektórzy badacze wiążą mastocyty z rozwojem fenotypu POChP z rozedmą śródzrzawkową. Oceniano również potencjalne znaczenie subpopulacji mastocytów bogatych w chymazę i tryptazę (komórki MC<sub>TC</sub>), wiążąc te komórki z ciężką obturacją i przebudową (remodelingiem) dróg oddechowych. Analiza stężenia tryptazy, głównego mediatora mastocytów, we krwi lub w indukowanej płwocinie, może stanowić biomarker aktywności i liczebności populacji tych komórek w POChP. Doktorantka, analizując dostępne piśmiennictwo wskazała, że stężenie tryptazy w płwocinie jest wyższe u chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi, i wydaje się korelować z parametrami wydolności układu oddechowego, a ponadto rośnie w zaostrzeniach POChP i obniża się po leczeniu. Doktorantka podsumowała, że brak jest kompleksowych badań oceniających stężenie tryptazy i powiązanie tego biomarkera z parametrami klinicznymi i czynnościowymi. Stąd jako główny cel swoich badań wybrała ocenę stężenia tryptazy w surowicy i płwocinie w różnych stadiach zaawansowania POChP. Jako cele szczegółowe wymieniono analizę związku pomiędzy stężeniem tryptazy w surowicy i płwocinie a wybranymi parametrami klinicznymi, funkcją płuc i parametrami systemowego stanu zapalnego.

Do badania zakwalifikowano 69 osób z czego 51 stanowiło grupę pacjentów z rozpoznaniem POChP, a 18 grupę osób zdrowych, aktualnych lub byłych palaczy tytoniu. Uzyskano zgodę komisji bioetycznej na przeprowadzenie badania. Przedstawiono cechy demograficzne analizowanych grup. Jako kryteria oceny klinicznej uwzględniono wywiad zaostrzeń oraz nasilenie objawów oceniane za pomocą powszechnie stosowanych skal CAT lub mMRC. U wszystkich pacjentów wykonano pomiary masy ciała, wzrostu, badania czynnościowe układu oddechowego, pobrano krew w celu oznaczenia stężenia tryptazy, morfologii i CRP. Badanie spirometryczne wykonano zgodnie z powszechnie akceptowanymi standardami, a stopień nasilenia obturacji zdefiniowano w zgodzie ze standardami GOLD. Procedurę indukcji płwociny wykonano zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc. Do oznaczenia stężenia tryptazy wykorzystano metodę ImmunoCAP, a pozostałe oznaczenia parametrów morfologii oraz CRP wykonało laboratorium USK we Wrocławiu. Analiza statystyczna przeprowadzona została z wykorzystaniem prawidłowo wybranych narzędzi za pomocą programu Statistica 13.1.

Podsumowując wyniki badania w pierwszej kolejności przedstawiono charakterystykę badanej grupy. Doktorantka zwróciła uwagę na fakt, że średnia liczba paczkołat w wywiadzie



była istotnie wyższa w grupie chorych w porównaniu z dobraną kontrolą. Istotne różnice stwierdzono analizując parametry stanu zapalnego (CRP i WBC). Opisano szczegółowo charakterystykę kliniczną badanej populacji chorych. Stwierdzono istotnie wyższe stężenie tryptazy w płwocinie a nie w surowicy chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie tryptazy w surowicy nie wykazywało istotnej korelacji z wiekiem, BMI oraz paleniem tytoniu. W przypadku tryptazy w płwocinie obserwowano ujemną korelację z liczbą paczkołat. Istotnie wyższe stężenia tryptazy w płwocinie obserwowano u kobiet i chorych na POChP w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami tryptazy w płwocinie i surowicy a czasem trwania objawów, parametrami ciężkości klinicznej, czy liczbą zaostrzeń choroby. Analizując potencjalne zależności z parametrami stanu zapalnego stwierdzono, że w podgrupie pacjentów z poziomem CRP powyżej 10 mg/L stężenie tryptazy w płwocinie było istotnie wyższe. Wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniami tryptazy w płwocinie a parametrami wydolności układu oddechowego takimi jak: FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub> wyrażonym jako procent wartości należnej oraz FEV<sub>1</sub>/FVC. Stężenie tryptazy w płwocinie było istotnie wyższe w podgrupie pacjentów z FEV<sub>1</sub> poniżej 1,5L. Co ciekawe nie wykazano istotnych różnic w stężeniach tryptazy w surowicy i płwocinie w zależności od stosowanego leczenia przeciwzapalnego (glikokortykosteroidy wziewne).

Doktorantka w dyskusji przedstawiła i krytycznie przeanalizowała wyniki swoich badań uwzględniając dane z dostępnego piśmiennictwa. Jednoznacznie wykazano, że stężenie tryptazy w płwocinie lepiej odzwierciedla potencjalne zaangażowanie mastocyta w badane procesy, w porównaniu ze stężeniem tego biomarkera w surowicy, a podwyższony poziom tryptazy może wskazywać na udział komórek tucznych w patomechanizmach leżących u podłoża rozwoju obrazu klinicznego POChP. Doktorantka sugeruje, że kluczową ścieżką aktywacji są raczej mechanizmy IgE-niezależne, być może z uwzględnieniem alarmin lub receptora AhR. W opisywanym badaniu stwierdzono pewną korelację poziomu tryptazy z wartościami CRP, które traktowane jest jako wykładnik zapalenia systemowego i związane ze stopniem ciężkości POChP oraz typowych współchorobowości. Doktorantka wykazała bezpośrednią korelację między stężeniem tryptazy w płwocinie a upośledzeniem parametrów wydolności układu oddechowego u chorych na POChP, a uzyskane wyniki są spójne z wcześniejszymi publikacjami. Co ciekawe zasugerowano, że w przyszłości stężenie tryptazy w płwocinie może wskazywać na konieczności intensyfikacji terapii u chorych na wcześniejszym etapie rozwoju POChP. Doktorantka słusznie zauważyła, że zaskakujący w opisywanych wynikach był brak istotnych korelacji stężeń tryptazy z parametrami opisującymi obraz kliniczny POChP, w tym z liczbą



zaostreń czy nasileniem objawów choroby. Jako ograniczenia pracy zwrócono uwagę na zbyt niską liczbę analizowanych pacjentów oraz brak oceny innych populacji komórek, co zapewne ułatwiło by wnioskowanie, między innymi w zakresie obrazu zaostreń choroby. We wnioskach końcowych podkreślono, że uzyskane wyniki wskazują na potencjalny udział mastocytów w patomechanizmach POChP, zaobserwowano związek stężenia tryptazy z cechami zapalenia systemowego oraz ujemną korelację z odpowiedzią na lek rozkurczowy. Cenne było by poszerzenie badań w innych fenotypach i stadiach zaawansowania POChP.

Do niewątpliwych zalet pracy należy zwrócenie uwagi na ciekawy, a dotychczas niedoceniany aspekt roli mastocytów w patomechanizmach rozwoju POChP. Bardzo obszernie i dokładnie omówiono we wstępie zagadnienia związane z morfologią, dojrzewaniem i aktywacją mastocytów oraz ich potencjalną rolę w procesach leżących u podłoża rozwoju POChP. Jasno i poprawnie zdefiniowano cele pracy, do których prawidłowo dobrano metody badawcze, zgodne z powszechnie akceptowanymi standardami. Dobór grupy kontrolnej jako osób palących lub byłych palaczy bez obrazu klinicznego rozwiniętego POChP jest ciekawym rozwiązaniem dążącym do homogenności wpływu ekspozycji na badany parametr. Wykazano znaczenie nowego biomarkera oraz wysunięto hipotezę o jego potencjalnym znaczeniu dla wcześniejszej i adekwatnej interwencji terapeutycznej. Cenne jest, moim zdaniem, wykazanie przewagi oznaczeń w materiale biologicznym powiązanym z miejscem toczącego się procesu zapalnego, w przeciwieństwie do oznaczeń w surowicy, które często nie uwzględniają złożonych procesów toczących się w całym organizmie. Jako ograniczenia Doktorantka podaje liczebność badanej grupy, ale biorąc pod uwagę pracochłonność i obciążenia wynikające z procedury indukcji plwociny jest to duże osiągnięcie organizacyjne. Gorąco zachęcam doktorantkę do publikacji wyników pracy, gdyż stanowi ona cenny wkład w naszą wiedzę dotyczącą patomechanizmów POChP.

Krytycznie analizując przedstawioną do recenzji pracę uważam, że pomimo bardzo obszernego opisanie potencjalnie różnych fenotypów, kliniki, patomechanizmów ograniczeniem prezentowanej analizy jest brak korelacji tryptazy z parametrami rozedmy, ocenianej nie tylko w badaniach obrazowych, lecz choćby za pomocą cech rozedęcia w badaniu bodypletyzmozograficznym, które stanowiło by proste uzupełnienie prezentowanego projektu badawczego. Opisując ograniczenia badania doktorantka słusznie zwróciła uwagę na liczebność grupy, ale biorąc pod uwagę praktyczne aspekty (procedura indukcji plwociny) wydaje się, że istotniejszym mankamentem jest brak rozważnej selekcji jednego, konkretnego, dobrze zdefiniowanego i dobrze wybranego na podstawie przytaczanych przez Doktorantkę

wcześniejszych publikacji fenotypu/endotypu POChP. Być może ułatwiło by to wykazanie jasnych korelacji i roli mastocytów w badanych procesach. Przy tak czasochłonnej i obciążającej procedurze jaką jest indukcja plwociny cenne było by nie tylko oznaczenie w dostępnym materiale liczby eozynofiliów, ale też innych biomarkerów np. wspomnianych w pracy alarmin. W dyskusji nie odniesiono się do niektórych obserwowanych wyników. Skąd potencjalnie wynikają różnice pomiędzy płcią męską a żeńską? Ponadto, opisując rolę biomarkera zawsze warto przytoczyć, o ile są dostępne, dane dotyczące uwarunkowań genetycznych i ich wpływu na stężenia analizowanego parametru. Przedstawione wyniki analizowano za pomocą prostych metod statystycznych. Obecnie, biorąc pod uwagę złożone aspekty homeostazy organizmu człowieka i naszą wiedzę dotyczącą powiązań i wzajemnych złożonych korelacji szeregu czynników, powszechnie akceptowane metody statystyczne uwzględniają analizy wieloczynnikowe badanych parametrów klinicznych i biomarkerów. Metoda regresji wielorakiej, dostępna w wykorzystanym oprogramowaniu, powinna zostać zastosowana do analizy wyników prezentowanego projektu. Przedstawiona w Tabeli II analiza statystyczna cech demograficznych i historia palenia tytoniu to już wynik pracy (rozdział 4) do której chyba Doktorantka odnosi się za pomocą sformułowania „tabela 3.1” na stronie 41. Powyższe sugestie i drobne uwagi edytorskie nie wpływają na wysoką ocenę merytorycznej wartości przedstawionej mi do recenzji pracy.

Podsumowując, jako recenzent pracy stwierdzam, że lekarz Agnieszka Kopeć w swojej rozprawie doktorskiej właściwie określiła cele badawcze, starannie przeprowadziła badania i wyciągnęła odpowiednie wnioski. Wysoko oceniam pomysł, zaangażowanie Doktorantki, warsztat badawczy oraz sposób krytycznej dyskusji osiągniętych wyników. Nie mam wątpliwości, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki 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). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie lekarz Agnieszki Kopeć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Maciej Kupczyk

5394102  
Prof. dr hab. n. med. Maciej Kupczyk  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista chorób płuc, alergolog