



Białystok, 06.06.2019r.

Dr hab. n. med. Napoleon Waszkiewicz

Klinika Psychiatrii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja pracy doktorskiej Elżbiety Kozłowskiej pt. „Wybrane parametry reaktywności układu odpornościowego w różnych chorobach psychicznych”.

Rozprawa doktorska mgr Elżbiety Kozłowskiej dotyczy charakterystyki zmian układu odpornościowego w różnych zaburzeniach psychicznych.

Jak pokazują ogólnoswiatowe badania pacjentów cierpiących na zaburzenia psychiczne, uszkodzenia bariery krew-mózg, dysfunkcje immunologiczne oraz schorzenia autoimmunologiczne są u nich często obserwowane. Współwystępowanie zaburzeń immunologicznych i psychicznych tłumaczone jest wspólnymi: czynnikami zapalnymi jak IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α), IFN- γ (interferon- γ) z obwodowych tkanek, jak i syntezowanych de novo przez komórki nerwowe, polimorfizmem genów kodujących transporter serotoniny (5-HTTLPR), teorią zaburzeń osi LHPA (limbiczno-podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej) i jej nadaktywnością w stresie, a także zaburzeniem metabolizmu tryptofanu i powstawaniem jego toksycznych prozapalnych metabolitów np. kinureny. Metabolity kinureny działają neurotoksycznie na komórki nerwowe wyzwalając kaskadę wolnych rodników tlenowych, modyfikując aktywność MAO



(monoaminooksydazy) wpływają na neuroprzekaźniki odpowiadające za stabilny nastrój, a przez wpływ na receptory NMDA -warunkują także powstanie psychoz. Szczególnie przesunięcie aktywności immunologicznej z Th1 do Th2 skutkuje zaburzeniami np. o charakterze psychoz. Dwukierunkowe połączenie układu odpornościowego oraz neuroendokrynnego jest więc istotne zarówno w leczeniu zaburzeń psychicznych, jak i ochrony OUN przez stopniową neurodegeneracją. Powyższe pokazują, że temat podjęty przez Doktorantkę jest jak najbardziej aktualny, interesujący oraz niezwykle istotny z punktu widzenia zdrowotnego.

Rozprawa doktorska mgr Elżbiety Kozłowskiej ma formę spójnego tematycznie cyklu pięciu publikacji, obejmujących badanie poziomu peptydu regulującego przebieg procesów immunologiczno-zapalnych (katelicyny LL-37) u pacjentów z depresją jednobiegunową, chorobą afektywną dwubiegunową oraz schizofrenią; badanie reaktywność komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC; ang. peripheral blood mononuclear cells) w warunkach in vitro, mierzoną poprzez zdolność wytwarzania cytokin u pacjentów ze schizofrenią oraz ekspresję cząsteczek TLR (ang. Toll-like receptor) w PBMC u pacjentów ze schizofrenią. Sumaryczna punktacja cyklu prac wynosi 9,029 IF oraz 130 MNiSW; we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Rozprawa doktorska liczy 74 strony i ma układ klasyczny dla prac doktorskich w formie cyklu publikacji. Zawiera spis treści, wprowadzenie, cele pracy, metodykę badań, omówienie wyników, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, kopie tych publikacji, a także inne załączniki w postaci kopii oświadczeń współautorów publikacji oraz wykaz pozostałego dorobku naukowego.



Rozprawa napisana jest jasno, pod względem redakcyjnym nie budzi zastrzeżeń, a proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami są odpowiednio zachowane.

We wstępie, Autorka w bardzo jasny i uporządkowany sposób przedstawiła teorie dotyczące układu odpornościowego oraz jego roli w powstawaniu zaburzeń psychicznych. Autorka posłużyła się aktualnym piśmiennictwem.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka przedstawiła cele badania (strona 5), które obejmowały określenie: 1) poziomu katelicyny LL-37 u pacjentów z depresją, chorobą afektywną dwubiegunową oraz schizofrenią; 2) reaktywności komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w warunkach in vitro, mierzonej poprzez zdolność wytwarzania cytokin u pacjentów ze schizofrenią; 3) ekspresji cząsteczek TLR w PBMC u pacjentów ze schizofrenią.

Materiał, metodyka oraz wyniki zostały zawarte w pięciu publikacjach oryginalnych. Omówienie w rozprawie doktorskiej badań wykonanych przez mgr Elżbietę Kozłowską jest poprawne, we właściwy sposób naświetla znaczenie kliniczne podjętych badań. Do realizacji założonych celów stosowano:

(1) metodę immunoenzymatyczną ELISA dla określenia poziomu katelicyny LL-37 w surowicy krwi;

(2) metodę izolacji PBMC z krwi pełnej pobranej na EDTA na gradiencie gęstości (Histopaque®-1077);

(3) hodowlę komórkową w warunkach in vitro natywnych i stymulowanych fitohemaglutyniną (PHA; ang. phytohemagglutinin) PBMC z zastosowaniem inkubatora w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂;



(4) technikę cytometrii przepływowej CBA (ang. cytometric bead array) dla oznaczenia stężenia cytokin IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-17A, IL-10 w nadsączach pochodowlanych;

(5) technikę qRT-PCR (ang. quantitative reverse transcriptase real-time PCR) w celu określenia poziomu ekspresji mRNA cząsteczek TLR w PBMC.

Realizację celów badawczych, Doktorantka przeprowadziła następnie w następujących etapach:

1. W pierwszym etapie pracy przeprowadzono ocenę poziomu katelicydyny LL-37 w surowicy krwi u pacjentów z zaburzeniem depresyjnym (n = 39), chorobą afektywną dwubiegunową (n = 80) i schizofrenią (n = 35). Poziom katelicydyny był również badany u osób zdrowych (n = 135).
2. W kolejnym badaniu oceniono dla porównania poziom LL-37 u osób z wybranymi chorobami infekcyjnymi - bakteryjnym zapaleniem płuc i gruźlicą płuc.
3. W kolejnych badaniach postanowiono ocenić zdolność PBMC (niestymulowanych i stymulowanych mitogenem PHA) uzyskanych od pacjentów ze schizofrenią (n = 27) oraz od osób zdrowych (n=27) do wytwarzania w warunkach in vitro cytokin promujących rozwój procesów zapalnych (IL-1 β , IL-17A i TNF), cytokiny o właściwościach immunoregulacyjnych (IFN- γ) oraz cytokiny przeciwzapalnej (IL-10).
4. Ponadto zbadano także ekspresję mRNA cząsteczek TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 i TLR9 przez PBMC,



otrzymanych od pacjentów ze schizofrenią (n = 27) i od osób zdrowych (n = 27).

„Materiał i metody” Doktorantka opisała satysfakcjonująco, uzupełniając w pracach opis rycinami i tabelami, co pozwala zainteresowanym osobom na posłużenie się nimi w celu przeprowadzenia podobnych metodologicznie badań.

Uzyskane wyniki, klarownie przedstawione, pozwoliły Doktorantce na ich podsumowanie, a następnie wysunięcie najważniejszych wniosków (strona 11 rozprawy doktorskiej):

- u chorych z depresją jednobiegunową oraz chorobą afektywną dwubiegunową dochodzi do znamienego wzrostu poziomu katelicyny LL-37
- u chorych ze schizofrenią zaobserwowano znaczące zmniejszenie poziomu peptydu LL-37, zwiększenie reaktywności PBMC na stymulację i w konsekwencji zwiększenie syntezy cytokin przez te komórki, a także zaobserwowano istotne zmiany poziomu ekspresji mRNA cząsteczek TLR w PBMC, w tym istotne obniżenie ekspresji mRNA TLR2 i TLR4.

Obserwacje powyższe znacząco podkreślają pogląd, że w etiopatogenezie chorób psychicznych istotne znaczenie ma dysregulacja procesów immunologicznych oraz rozwój procesów zapalnych.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską lek. Elżbiety Kozłowskiej należy – niezależnie od podkreślenia jej walorów poznawczych – odnotować kilka niezwykle ważnych jej pozytywnych aspektów:

- do niewątpliwych osiągnięć Doktorantki – nadających rozprawie oryginalność – należy podjęcie badań nad zagadnieniem ważnym z



klinicznego punktu widzenia, a będącym przedmiotem jeszcze niewielkiej liczby doniesień, szczególnie jeśli chodzi o ocenę katelicydyny (LL-37) w aspekcie zaburzeń psychicznych

- reaktywności PBMC na stymulację i w konsekwencji zwiększenie syntezy cytokin przez te komórki, a także zaobserwowane istotne zmiany poziomu ekspresji mRNA cząsteczek TLR w PBMC może pomóc w zrozumieniu zależności reaktywności psychicznej od reaktywności immunologicznej
- badania wskazują na konieczność stosowania odmiennych interwencji terapeutycznych w różnych schorzeniach psychicznych, w tym na potencjalnej istotności uwzględniania także leczenia przeciw- lub pro-immunologicznego.

Lektura pracy doktorskiej nasuwa jedynie nieliczne uwagi, przedstawione z obowiązku recenzenta:

- miło byłoby dowiedzieć się więcej ze wstępu na temat roli zaburzeń immunologicznych i autoimmunologicznych, szczególnie przesunięć w układzie Th1 i Th2 w zaburzeniach psychotycznych i niepsychotycznych
- należałoby rozwinąć hipotezy badawcze

Podsumowując, badania podjęte przez mgr Elżbietę Kozłowską znajdują pełne uzasadnienie, zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób prawidłowy metodycznie, a uzyskane wyniki Doktorantka przedyskutowała w sposób bardzo dojrzały. Wyróżnienia wymaga podjęcie się dość skomplikowanych metodologicznie prac łączących wiele bardzo dobrze i klarownie dobranych metod statystycznych.



Poza tym, Doktorantka wykazała się szeroką znajomością literatury z zakresu zagadnień dotyczących tematu pracy. Nieliczne uwagi zostały dokonane z obowiązku recenzowania i nie mają kardynalnego wpływu na całościową ocenę rozprawy.

Reasumując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Kozłowskiej, na którą składa się pięć publikacji, które zostały opublikowane w międzynarodowych i renomowanych czasopismach, zawiera dane o istotnym znaczeniu naukowym i praktycznym, a uzyskane wyniki stanowią znaczący wkład do dotychczasowej wiedzy na temat znaczenia immunologii w psychiatrii. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, Doktorantka odpowiedziała i zrealizowała wszystkie postawione pytania i cele badawcze, wykazała się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych; tym samym rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom promocyjnym na stopień doktora.

W związku z tym, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o **dopuszczenie** mgr Elżbiety Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie pracy** z racji na ogromną istotność jej wyników do zrozumienia immunologicznego uwarunkowania zaburzeń psychicznych, które oparte są na bardzo dobrze dobranych grupach i metodach statystycznych, a zostały opublikowane w renomowanych czasopismach.


Dr hab. n. med. Napoleon Waszkiewicz
specjalista psychiatra
1754 124



