



Prof. dr hab. Katarzyna Sikorska

Gdynia, dnia 29 listopada 2023r.

Kierownik Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych

Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii

Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Wydział Nauk o Zdrowiu z IMMiT

Gdański Uniwersytet Medyczny



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Diany Martonik zatytułowanej „Wpływ leczenia immunomodulującego na przebieg burzy cytokinowej u pacjentów z COVID-19”.

Pandemia COVID-19, której historia zaczęła się zaledwie przed 4 laty, jak dotąd stanowi globalnie największe zagrożenie dla zdrowia publicznego w XXI wieku. Wraz z nowym chorobotwórczym dla człowieka koronawirusem SARS-CoV-2 pojawiło się wiele ekstremalnie trudnych wyzwań w bardzo różnych obszarach, a wśród nich te związane z epidemiologią zakażeń, biologią molekularną i zmiennością genetyczną wirusa, potrzebą wdrażania szybkiej i skutecznej diagnostyki, ograniczoną wiedzą o patomechanizmie choroby i co kluczowe w aspekcie klinicznym - brakiem skutecznych narzędzi terapeutycznych. Od początku zmagania z chorobą poszukiwano efektywnych form leczenia, o aktywności przeciwwirusowej, a także modulującej odpowiedź immunologiczną, zapalną w infekcji SARS-CoV-2, gdyż ta w badaniach czynników kształtujących przebieg kliniczny okazała się odgrywać istotną, niekorzystnie prognostyczną rolę. Także teraz, gdy odwołane zostały wszelkie obostrzenia pandemiczne i utrwaliło się przekonanie o malejącej skali zagrożenia związanego z SARS-CoV-2, nie należy pomniejszać wartości badań oceniających rolę terapii



immunomodulacyjnej. Niestety, aktywna transmisja nowych wariantów koronawirusa trwa, a doświadczenia ostatnich tygodni z rosnącą liczbą chorych z COVID-19 w szpitalach, także zgonów z tego powodu nie nastroją optymistycznie i ponownie nakazują weryfikację podejścia do celowanej terapii p/wirusowej czy terapii p/zapalnej, immunomodulacyjnej, których wykorzystanie może okazać się konieczne. Temat badawczy rozprawy doktorskiej postrzegam jako aktualny i poznawczo w pełni uzasadniony, także w kontekście prognozowanych zagrożeń dla zdrowia człowieka nowymi gatunkami odzwierzęcych koronawirusów.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi zasadniczo cykl dwóch spójnych tematycznie prac (jedna oryginalna i jedna pogładowa), opublikowanych w recenzowanych czasopismach, o łącznej punktacji IF: 14,966 i MEiN: 280. Publikacje te stanowią część przygotowanego zwartego opracowania, liczącego 63 strony, w skład którego wchodzi również rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, wnioski, streszczenia w językach polskim i angielskim, piśmiennictwo, zgoda komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań oraz informacje o udziale współautorów publikacji. Pani mgr Diana Martonik jest pierwszą autorką obu artykułów, a jej istotny wkład w ich przygotowanie dodatkowo potwierdzają oświadczenia współautorów dołączone do opracowania rozprawy doktorskiej.

Zdefiniowane cele pracy doktorskiej obejmowały: (i) analizę wpływu leczenia, zarówno przeciwwirusowego jak i immunomodulującego, na przebieg „burzy cytokinowej” u pacjentów z COVID-19, (ii) określenie profilu cytokin wydzielanych podczas zakażenia SARS-CoV-2 i wybranych subpopulacji limfocytów T w odniesieniu do ciężkości przebiegu choroby oraz (iii)



ocenę poziomu wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-17A i IL-22 przez wybrane subpopulacje limfocytów. Cele te są prawidłowo sformułowane.

Praca przeglądowa „*The role of Th17 Response in COVID-19*” autorstwa D. Martonik, A. Parfieniuk-Kowerda, M. Rogalska, R. Flisiak, opublikowana w czasopiśmie *Cells* stanowi syntetyczne opracowanie wybranych zagadnień związanych z immunopatologią zakażenia SARS-CoV-2, przede wszystkim w odniesieniu do zjawiska silnej indukcji cytokin prozapalnych, obserwowanego w ciężkim przebiegu klinicznym COVID-19 i ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnej roli subpopulacji Th17 w patogenezie zapalenia płuc, które w przypadkach o niepomyślnym przebiegu wiązało się z ryzykiem gwałtownego rozwoju niewydolności oddechowej. Artykuł ten przygotowany w oparciu o staranny i rzetelny przegląd literatury, zakończony przedstawieniem nowej możliwej strategii terapeutycznej i przywołaniem toczących się badań klinicznych z wykorzystaniem nowych leków biologicznych, stanowi oczywiste wprowadzenie w treści pracy oryginalnej.

W pracy oryginalnej pt. “*Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19*”, autorstwa D. Martonik, A. Parfieniuk-Kowerda, A. Starosz, K. Grubczak, M. Moniuszko, R. Flisiak, opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Immunology*, przedstawione zostały wyniki badań parametrów immunologicznych u 44 chorych z rozpoznaniem COVID-19, leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w okresie od stycznia do maja 2021 roku. Profile cytokin, subpopulacje limfocytów T oraz wewnątrzkomórkową ekspresję IL-17A i IL-22 porównywano na tle różnych parametrów klinicznych i laboratoryjnych



powiązanych z ciężkością przebiegu klinicznego choroby (udział procentowy limfocytów, stężenie CRP, D-dimeru, fibrynogenu, aktywność LDH, aminotransferaz, SpO₂, zmiany w płucach), w grupach pacjentów o umiarkowanie nasilonym i ciężkim przebiegu choroby, w momencie przyjęcia do szpitala oraz po 5 dniach leczenia. Uzyskane wyniki badań wykonanych przy przyjęciu do szpitala odniesiono do wyników analizy w grupie kontrolnej, liczącej 20 zdrowych ochotników zaszczepionych p/SARS-CoV-2. Ciekawi mnie zamysł takiego doboru badanych do grupy kontrolnej i poproszę o komentarz doktorantki w trakcie obrony. Pacjentów grupowano także według metody leczenia, jako leczonych tylko p/wirusowo remdesivirem, tylko immunomodulacyjnie deksametazonem i/lub tocilizumabem oraz otrzymujących łącznie leczenie p/wirusowe i immunomodulacyjnie. Kryteria kwalifikacji do badania dla chorych zakażonych SARS-CoV2 były jasno, jednoznacznie zdefiniowane, analizą objęto pacjentów ze zmianami zapalnymi w płucach, a wykluczenie stanowiły choroba nowotworowa, autoimmunizacyjna i wcześniej stosowane leczenie immunomodulacyjne. Taki dobór chorych do grupy badanej był jak najbardziej poprawny, gdyż stwarzał z dużym prawdopodobieństwem szansę na uzyskanie maksymalnie obiektywnych i wiarygodnych wyników analizy. Warto podkreślić, że projekt realizowano w okresie wzmożonej zapadalności na COVID-19, w sytuacji gdy personel medyczny zmagał się z potężnymi wyzwaniami wynikającymi z organizacji pracy w dużym stopniu uciążliwej ze względu na konieczność izolacji chorych, potrzebę ścisłej ochrony samych pracowników medycznych (niezbędnej dla zapewnienia ciągłości w udzielaniu świadczeń medycznych) oraz psychiczne obciążenia związane z dramatycznym przebiegiem choroby w wielu przypadkach. Rekrutacja chorych do określonych grup zależnie od modelu leczenia była najpewniej ściśle powiązana z decyzjami



terapeutycznymi podejmowanymi adekwatnie do rozwijającej się sytuacji klinicznej. Ciekawie mnie jaki był rozkład liczbowy w poszczególnych grupach chorych leczonych według różnych schematów.

Warunki pracy w oddziale zakaźnym w czasie pandemii z pewnością nie ułatwiały realizacji zadań związanych z projektem badawczym, w tym rekrutacji potencjalnych uczestników, z których część mogła w ogóle nie być zdolna do wyrażenia świadomej zgody na badanie ze względu na powikłania zakażenia SARS-CoV-2. Tym bardziej należy docenić wysiłek i determinację autorów tego naukowego przedsięwzięcia.

Stężenia w surowicy IL-17A, IL-17F, CCL5/RANTES, GM-CSF, IL-4, IL-10, CXCL10/IP-10 i IL-6 okazały się istotnie wyższe u pacjentów przyjmowanych do szpitala w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Ponadto wyższe stężenia IL-10 i CXCL10/IP-10 różnicowały ciężki przebieg z umiarkowanym. W porównaniu do zdrowych w grupie kontrolnej całkowita liczba limfocytów była wyraźnie niższa w grupie chorych, podobna obserwacja dotyczyła subpopulacji limfocytów CD4 i CD8, choć same grupy o umiarkowanym i ciężkim przebiegu między sobą się nie różniły. Jednakże, odsetek CD4 i CD8 wykazujących ekspresję IL-17A był wyższy w obu grupach chorych z COVID-19, a odsetek CD4 wydzielających IL-22 był wyższy w stosunku do grupy kontrolnej jedynie u umiarkowanie ciężko chorych. Ciekawą i wartościową obserwacją było to, że przy wykazaniu już wykrywalnych różnic dla mierzonych parametrów immunologicznych, grupy chorych o umiarkowanie ciężkim i ciężkim przebiegu nie różniły się długością trwania objawów choroby do momentu rekrutacji (mediana w obu grupach wyniosła 7 dni, przy przedziałach czasowych 5-9 i 5-10 dni). Nie różnicowały tych



grup w sposób jednoznacznie silny także parametry kliniczne (poza wynikami pomiarów aktywności LDH, dla których różnica osiągnęła statystyczność istotną), kojarzone w oparciu o szereg obserwacji klinicznych z ryzykiem rozwoju tzw. burzy cytokinowej i ciężkiego przebiegu COVID-19, także znaczny stopień zajęcia płuc, porównywalny w obu grupach. Być może ze względu na niedługi czas obserwacji do momentu rekrutacji. Tym bardziej obserwacje doktorantki korespondują z wnioskami prac badawczych ze świata, poświęconych znaczeniu złożonych i zróżnicowanych reakcji immunologicznych dla obrazu klinicznego COVID-19. Przemawiają za udziałem osobniczych czynników modyfikujących przebieg choroby, w tym związanych z niepomyślnym przebiegiem i zgonem. Ich pełna, kompletna identyfikacja mogłaby przyczynić się do opracowania skutecznych form leczenia.

W obserwacji zmian profilu cytokin i subpopulacji limfocytów wykonanej w 5 dniu leczenia odnotowano w grupie o ciężkim przebiegu w porównaniu do umiarkowanie ciężko chorych wyższe stężenia nie tylko IL-10 i CXCL10/IP-10, ale także IFN-gamma, CCL-2/MCP-1 oraz IL-6, mimo że uległy one obniżeniu w porównaniu do pomiarów z momentu włączenia do badania. W jakim stopniu można to tłumaczyć efektem działania zastosowanego leczenia czy braku określonej opcji terapeutycznej, a jak efektem naturalnej ewolucji choroby rozwijającej się w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2? Szczególnie, że w porównywaniu grup podzielonych ze względu na rodzaj zastosowanego leczenia wyraźną różnicę odnotowano dla subpopulacji limfocytów CD4 z ekspresją IL-22, której odsetek był niższy u leczonych tylko immunomodulacyjnie. Poproszę też o komentarz dotyczący uzyskanych wyników wśród ciężko chorych, gdzie wzrost stężeń IL-17A i IL-22 nie koresponduje ze wzrostem właściwej populacji limfocytów T.



Dla mnie, jako klinicysty ciekawe byłoby oczywiście odniesienie mierzonych parametrów immunologicznych do zejścia choroby, ryzyka zgonu czy rozwoju odległych powikłań COVID-19. Nie było to przedmiotem pracy doktorskiej Pani mgr. Martonik, ale z pewnością uzyskane wyniki inspirują do prowadzenia dalszych badań.

Wyniki analizy porównującej chorych w grupach według ciężkości objawów (przebieg umiarkowany vs ciężki) potwierdzają znaczenie osobniczego, indywidualnego profilu immunologicznego i dynamiki wzrostu natężenia, nierzadko gwałtownego, reakcji zapalnej w przebiegu klinicznym COVID-19, a przede wszystkim w szacowaniu ryzyka wystąpienia niewydolności oddechowej. Poza przewagą płci męskiej wśród chorych o ciężkim przebiegu, grupy nie różniły się częstością współistnienia innych chorób (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, astma, zaburzenia gospodarki lipidowej), rozkładem objawów (gorączka, kaszel, duszność, zmęczenie) czy natę zmian chorobowych w płucach w badaniu obrazowym.

Te spostrzeżenia wskazują jak ważne dla rozumienia patomechanizmu COVID-19, a co za tym idzie dla opracowania jak najskuteczniejszej strategii postępowania diagnostyczno-terapeutycznego i przeciwdziałania tragicznym następstwom choroby toczącej się w sposób niekontrolowany, miały i mają badania immunologiczne. Praca doktorska Pani mgr. Diany Martonik w pełni wpisuje się w proces poznawczy patologii powiązanej z zakażeniem SARS-CoV-2 i uzupełnia go o nowe dane, które w dalszej perspektywie mogą posłużyć do konstruowania nowych propozycji terapeutycznych.

Potwierdzam zatem istotny wkład niniejszej rozprawy doktorskiej w rozwój szeroko rozumianej wiedzy o uwarunkowaniach klinicznego obrazu COVID-19.



Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Diany Martonik spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742) i wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Skonka