Łódź, 18.09.2017r.

OCENA

dorobku naukowego, dydaktycznego, organizacyjnego i rozprawy habilitacyjnej pt.: „Wykorzystanie cytometrii przepływowej do diagnostyki pierwotnych zaburzeń produkcji przeciwciał" dr n. przyr. Barbary Piątosy, kierownika Pracowni Zgodności Tkankowej Instytutu Pomnika Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, kandydatki na stopień naukowy doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.

Dr. Barbara Piątosa jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego z roku 1979. Po studiach rozpoczęła pracę w Instytucie Pomniku Centrum Zdrowia Dziecka jako diagnosta laboratoryjny (prawdopodobnie, gdyż nie jest to opisane w życiorysie zawodowym) i aktualnie jest Kierownikiem Pracowni Zgodności Tkankowej w Instytucie. Swoje zainteresowania zawodowe całkowicie związała z diagnostyką laboratoryjną uzyskując prawo wykonywania zawodu diagnosty oraz kwalifikacje specjalisty laboratoryjnej immunologii medycznej. W pracy zawodowej oraz naukowej skupiała się głównie na twórczym rozwinięciu metody cytometrii przepływowej - kluczowej techniki badań immunologicznych, a zwłaszcza na diagnostyce niedoborów odpornościowych u dzieci.

Od pierwszych lat pracy Kandydatka podwyższała swoje kwalifikacje diagnostyczne. Odbyła liczne staże szkoleniowe w zakresie diagnostyki immunologicznej w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych: Uniwersytecie w Heidelbergu, Uniwersytecie Kalifornijskim w Los Angeles i Great Ormond Street Hospital w Londynie.

Poza kierowaniem pracowni w IPCZD, od 2013 roku pełni funkcję kontrolera w pracowniach zgodności tkankowej – obecnie jako główny specjalista w Krajowym Centrum Bankowania Tkanek i Komórek.

Rozwój naukowy

W roku 1989 na Wydziale Biologii swojej macierzystej Uczelni uzyskała stopień doktora nauk przyrodniczych na podstawie pracy „ Ocena testu zahamowania migracji leukocytów z izolowanymi antygenami mleka w diagnostyce alergii na mleko krowie"

Przed i po uzyskaniu doktoratu Kandydatka była autorką i współautorką publikacji oryginalnych o łącznym wskaźniku wpływu **IF** około **38** pkt i ponad **400** pkt MNiSW (liczone „ręcznie", gdyż dokładna bibliometria IPCZD obejmuje niestety również prace włączone do dysertacji).

Kandydatka (poza publikacjami włączonymi do rozprawy habilitacyjnej) jest pierwszą autorką siedmiu publikacji oryginalnych zamieszczonych w czasopismach międzynarodowych indeksowanych w bazie JRC o **IF** ponad **6.3** pkt oraz pięciu publikacji spoza tej listy. Łączna punktacja **MNiSW** za pierwszo-autorskie prace wynosi **93** pkt.

Dr Piątosa jest również współautorką ponad 20 prac oryginalnych, w tym dwunastu zamieszczonych w czasopismach z bazy JRC i ośmiu spoza tej listy, o łącznej punktacji **IF** ponad **31**, oraz ponad **340** pkt **MNiSW.**

Doniesienia zjazdowe: Dr Piątosa jest autorką i współautorką 72 doniesień zjazdowych których streszczenia zamieszczono w 59 krajowych i międzynarodowych czasopismach indeksowanych w bazie Journal of Citation Reports oraz w 13 materiałach zjazdowych.

Indeks Hirscha Kandydatki z końca 2016 roku wynosi 7 a publikacje Autorki cytowano łącznie 149 razy w czasopismach międzynarodowych.

Kierowała jednym projektem naukowym oraz była współwykonawcą sześciu innych projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki oraz wykonawcą w siedmiu projektach statutowych Instytutu Pomnika Centrum Zdrowia Dziecka.

Kandydatka jest członkiem wielu towarzystw naukowych, w tym Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, European Federation of Immunogenetics, European Society for Immunodeficiencies.

Działalność naukową dr Barbara Piątosa rozpoczęła cyklem prac oryginalnych dotyczących immunologicznych i diagnostycznych aspektów transplantacji nerek. Niestety, brak jest dostępu do publikacji, lub ich streszczeń z pierwszych lat jej działalności naukowej.

W autoreferacie Kandydatka również nie odnosi się do swoich dokonań naukowych sprzed 2002 roku. Jedynie na podstawie tytułów można wnioskować czego one dotyczą.

Badania w których uczestniczyła Kandydatka po 2000 roku miały na celu określenie następstw wytworzenia u biorcy przeciwciał anty-HLA po przeszczepie tkanek allogenicznych takich jak zastawki serca oraz nerki. Większość z biorców zastawek allogenicznych przejściowo wytwarzała przeciwciała IgG przeciw antygenom HLA klasy I lub II, jednak ich obecność nie miała żadnego wpływu na stan pacjenta. Rola przeciwciał anty-HLA wytwarzanych u ponad 80% biorców tracących przeszczepioną nerkę z powodu zakrzepicy naczyń nerkowych jest niejasna. Zakrzepica występująca w pierwszych dniach po transplantacji lub w okresie późniejszym nie kojarzyła się z morfologicznymi wykładnikami odrzutu przeszczepu a uzyskany przez Kandydatkę wynik stwierdzający występowanie przeciwciał nie rozstrzyga kwestii ich roli w powstaniu zakrzepicy. Powyższe wyniki badań zostały zamieszczone w roku 2002 w *Transplantation Proceedings.*

Kolejnymi pracami kierowanymi przez Kandydatkę były badania roli przeciwciał przeciw antygenom dawcy w dysfunkcji przeszczepianych nerek. Wykonano próby krzyżowe z wykorzystaniem cytometru przepływowego (FCXM) w prognozowaniu wystąpienia wczesnego odrzutu przeszczepionej nerki u 63 pacjentów. Stwierdzono znacząco wyższy odsetek wystąpienia opóźnionej funkcji nerki przeszczepionej lub konieczności hemodializy u biorców z obecnością IgG lub IgM przeciw limfocytom T lub B dawcy. Podobną metodę badania zastosowano w retrospektywnej ocenie ostrego odrzutu nerki. Konkluzją obu prac jest wniosek o konieczności szczególnego nadzoru nad przebiegiem klinicznym po transplantacji w pacjenta z dodatnim testem FCXM, jako biorcy o wyższym ryzyku dysfunkcji i/lub odrzutu przeszczepionej nerki. Jest to szczególnie istotne przy obecności przeciwciał klasy IgM. Wyniki obu prac Kandydatka opublikowała w 2006 roku w *Transplantation Proceedings* i w 2011 roku w *Annals of Transplantation.*

Kandydatka współuczestniczyła w badaniach tzw. przeciwciałozależnych odrzutów przeszczepu i oceniała rolę przeciwciał anty-HLA w epizodach ostrego odrzucania przeszczepów allogenicznych wątroby rejestrowanych w tkankach pobranych podczas kontrolnej biopsji. U 30% biorców występowały epizody odrzutu potwierdzone uwidocznieniem w naczyniach depozytów składowych dopełniacza C4, lecz jedynie u części tych pacjentów stwierdzono pewien związek występowania przeciwciał anty-HLA-DR z depozytami C4d. Badania opublikowano w 2013 roku w *Annals of Transplantation.*

Dr Piątosa uczestniczyła w wieloośrodkowym badaniu z użyciem mysiego modelu choroby Brutona. Udział Kandydatki w tym wysoce zaawansowanym metodycznie eksperymencie polegał na opracowaniu cytometrycznej oceny ekspresji kinazy tyrozynowej Brutona. Zaproponowany model korekcji zmutowanego genu BTK u myszy przywrócił jego prawidłową funkcję i zdolność do aktywacji limfocytów B. Praca została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *The Journal of Clinical Investigation* w roku 2014.

Kandydatka jako doświadczony diagnosta immunolog uczestniczyła również w innym wieloośrodkowym badaniu zaburzeń immunologicznych dzieci z zespołem Nijmegen oraz w ocenie immunologicznego podłoża włóknienie przeszczepianej wątroby u dzieci. Publikacje zawierające wnioski z tych badań zamieszczono w 2015 roku w *Journal of Clinical Immunology* oraz w *Annals of Transplantation.*

Rozprawa habilitacyjna pt. „Wykorzystanie cytometrii przepływowej do diagnostyki pierwotnych zaburzeń produkcji przeciwciał" ma formę zbioru pięciu publikacji oryginalnych oraz jednej przeglądowej opublikowanych w czasopismach międzynarodowych o łącznym IF powyżej 11pkt. We wszystkich pracach Kandydatka jest pierwszym i głównym autorem. Publikacje zamieszczone w zestawieniu stanowią podsumowanie całego cyklu badań zaplanowanych i kierowanych przez dr Barbarę Piątosę.

Zbiór rozpoczyna opublikowana w 2007 roku w *Central European Journal of Immunology* praca przeglądowa omawiająca możliwości diagnostyczne cytometrii w rozpoznawaniu pierwotnych niedoborów odporności. Publikacja zawiera wiele praktycznych zaleceń metodycznych, kluczowych dla rzetelnej pracy z użyciem cytometru przepływowego, opisuje błędy wynikające z niewłaściwego pobrania, utrwalania czy przechowywania pobranej próbki krwi oraz izolowania, barwienia czy „bramkowania" określonej populacji krwinek. Autorka podkreśla konieczność precyzyjnego określenia ilościowych i odsetkowych norm subpopulacji limfocytów we krwi zdrowych dzieci w różnych przedziałach wiekowych, głównie z powodu szybko zmieniających się odsetków subpopulacji limfocytów T i B w pierwszych latach ich życia. Jest to zdaniem Autorki niezbędny warunek precyzyjnego wykrywania występujących we krwi nieprawidłowych ilości krwinek prawidłowych lub obecności komórek patologicznych. Kandydatka przedstawia algorytmy stosowane przy cytometrycznej diagnostyce niektórych przyczyn pierwotnych niedoborów odporności oraz rolę oznaczania ekspresji określonych markerów linii rozwojowej limfocytów B w szpiku.

Kolejna publikacja analizująca wartości subpopulacji leukocytów krwi obwodowej u polskich dzieci stanowi realizację postawionego w poprzedniej pracy celu. Badanie wykonane w grupie prawie 300 zdrowych dzieci w wieku od 1 dnia do 18 roku życia pozwoliły na stworzenie wartości referencyjnych dla wartości bezwzględnych i odsetkowych populacji leukocytów, limfocytów T i B w krwi obwodowej. Praca również została opublikowana w *Central European Journal of Immunology* w roku 2010.

Następna publikacja opisuje badania, wykonane na tej samej grupie dzieci i w tym samym przedziale wiekowym, które umożliwiły ustalenie wartości referencyjnych dla populacji limfocytów B krwi obwodowej. Wyniki prezentują odsetkowe i bezwzględne wartości limfocytów B z podziałem na ich niedojrzałe i dojrzałe subpopulacje u dzieci w różnych grupach wiekowych. Powyższa praca, kluczowa dla właściwej interpretacji wyników badań dzieci z podejrzeniem zaburzeń wytwarzania przeciwciał, została opublikowana w *Cytometry* w roku 2010.

Logiczną kontynuacją prowadzonych przez Kandydatkę badań była ocena zmian składu prekursorów limfocytów B w szpiku zdrowych dzieci od wieku noworodkowego do 16 roku życia. Analizę mielogramu u 59 hematologicznie zdrowych dzieci w wieku od 14 dnia do 10 roku życia dokonano w trakcie pobierania komórek macierzystych do przeszczepów rodzinnych lub z krwi szpikowej pobranej z mostka w trakcie operacyjnej korekty wad wrodzonych serca. Brak jest precyzyjnych wartości referencyjnych dla składu komórkowego mielogramu u zdrowych dzieci w wąskich przedziałach wiekowych gdyż uzyskanie materiału porównawczego drogą biopsji szpiku jest utrudnione z oczywistych powodów. Wyniki uzyskane przez Autorkę wskazują na znaczący wzrost odsetka subpopulacji pro- i pre-B limfocytów w ciągu pierwszych miesięcy życia z późniejszym spadkiem poniżej 2 roku życia do wartości utrzymujących się na stabilnym poziomie do 10 roku. Duża zmienność odsetka prekursorów linii B w pierwszych miesiącach życia utrudnia diagnostykę najmłodszych dzieci z podejrzeniem pierwotnych niedoborów odporności, dlatego uzyskane wyniki mogą służyć jako wartości referencyjne w interpretacji wyników mielogramów. Wyniki Autorka opublikowała w 2013 roku w *Cytometry*.

Kolejne badania dotyczące oceny dojrzewania limfocytów B w krwi obwodowej u 36 dzieci z zespołem Nijmegen wykazały znaczną limfopenię niezależną od wieku badanych dzieci i bardzo niski odsetek limfocytów B. Znamiennie podwyższone odsetki komórek NK i

obniżone wartości odsetkowe limfocytów T (głównie pomocniczych) były wyrażone najsilniej w pierwszych latach życia. Znaczące zmiany odsetków subpopulacji limfocytów B w krwi obwodowej dzieci z zespołem Nijmegen dowodzą zaburzeń głównie ich T zależnej aktywacji i różnicowania. Jest to główny wniosek wypływający z badań opublikowanych w *Cytometry* w roku 2012.

Pospolity zmienny niedobór immunologiczny (CVID) jest dość trudną do zdiagnozowania chorobą o złożonej i niejednorodnej etiologii i choć należy do pierwotnych niedoborów odpornościowych jest dość późno rozpoznawany. Ze względu na dominujące w tej chorobie nawracające infekcje i hipogammaglobulinemię dr Piątosa postanowiła dokonać oceny obwodowego dojrzewania limfocytów B u 49 dzieci z podejrzeniem CVID. Ocena morfologii krwi i liczby limfocytów w trakcie obserwacji dzieci była retrospektywna. Bardzo różnorodny obraz kliniczny niedoboru u dzieci utrudnił znalezienie relacji stanu klinicznego z poziomem przeciwciał oraz zmianami w dojrzewaniu limfocytów B na obwodzie. U części pacjentów następowało z wiekiem obniżenie odsetka limfocytów B. Zaburzenia dojrzewania limfocytów B na wczesnych etapach skojarzone były z cięższymi objawami klinicznymi: częstszym występowaniem enteropatii, trombo- i leukocytopenii, ziarniniaków płuc, wątroby dziąseł które wymagały wczesnej terapii zastępczej immunoglobulinami. Wyniki badań zostały przez Autorkę opublikowane w 2013 roku w czasopiśmie *Journal of Clinical Immunology*.

Cele i wyniki wszystkich prac włączonych do dysertacji zostały podsumowane w autoreferacie. Umieszczenie w ocenianej rozprawie naukowej prac o charakterze metodycznym, zawierających liczne zalecenia przydatne dla każdego badacza stosującego metodę cytometrii przepływowej, zwiększa moim zdaniem wartość całej rozprawy habilitacyjnej. Dysertacja obok wysokich walorów naukowych prezentuje duże znaczenie aplikacyjne. Doskonała znajomość warsztatu znakomicie podnosi zaufanie do wartości wyników przedstawionych w publikacjach i świadczy zarówno o ogromnym doświadczeniu praktycznym jak i zaawansowaniu naukowym.

Działalność dydaktyczna

Kandydatka bierze czynny udział w przeddyplomowej i podyplomowej działalności dydaktycznej. Organizuje staże kierunkowe w zakresie laboratoryjnej immunologii medycznej i immunologii klinicznej dla studentów i lekarzy oraz jest kierownikiem specjalizacji

czterech lekarzy (2 specjalizacje ukończone) specjalizujących się w laboratoryjnej diagnostyce medycznej.

Od 2005 roku prowadzi liczne wykłady szkoleniowe z dziedziny niedoborów odpornościowych, transplantologii, diagnostyki immunologicznej z zastosowaniem cytometrii, na kursach organizowanych przez CMKP.

Za ważną działalność dydaktyczną Kandydatki uważam opublikowanie w czasopiśmie krajowym pracy popularno-naukowej, 2 rozdziałów w książce o aspektach metodycznych transplantologii oraz dwóch tłumaczeń artykułów z prasy międzynarodowej w polskim czasopiśmie fachowym.

Wniosek końcowy

Dorobek naukowy doktor Barbary Piątosy jest bardzo obszerny, prace naukowe z dziedziny diagnostyki immunologicznej łączą w sobie znaczące walory poznawcze jak i praktyczne. Wszystkie publikacje naukowe Kandydatki są doskonałym materiałem dydaktycznym dla każdego immunologa i diagnosty a wiele z tych publikacji zawiera twórcze rozwinięcie dotychczas stosowanych metod laboratoryjnych.

Rozprawę habilitacyjną oceniam wysoko. Badania dojrzewania limfocytów B w szpiku i krwi obwodowej u dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności są bardzo zaawansowane metodycznie i świadczą o doskonałym przygotowaniu warsztatowym i naukowym. Dyskusja uzyskanych wyników i wnioskowanie potwierdzają doświadczenie diagnostyczne i rozległą wiedzę Kandydatki na temat pierwotnych zaburzeń produkcji przeciwciał. Sama rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane tego typu dysertacjom. Wszystkie powyższe powody skłaniają mnie do zwrócenia się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie doktor Barbary Piątosy do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Prof. dr hab. Zbigniew Baj

KIEROWNIK
Zakładu Patofizjologii i Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Zbigniew Baj