



Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr Driesa Van Elsta

pt. „BADANIA MECHANIZMÓW ENDOTYPU ASTMY ZWIĄZNEGO Z ZESPOŁEM
METABOLICZNYM – WPŁYW HORMONÓW NA FUNKCJE KOMÓREK MIĘŚNI
GŁADKICH OSKRZELI”

„MECHANISMS OF ASTHMA ENDOTYPE ASSOCIATED WITH THE METABOLIC
SYNDROME – THE EFFECTS OF HORMONE STIMULATION ON THE BRONCHIAL
SMOOTH MUSCLE CELLS”

wykonanej

w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pod kierunkiem prof. dr. hab. n. med. Marka Jutela (promotor)

oraz dr n. med. Magdaleny Zemelki-Więcek (promotor pomocniczy).

Astma oskrzelowa stanowi istotny problem kliniczny, dotykając około 5-10% społeczeństwa w zależności od położenia geograficznego. U części pacjentów astma współistnieje z otyłością i zespołem metabolicznym, co zwykle przekłada się na cięższy przebieg choroby wymagający odrębnego podejścia terapeutycznego. Choć astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych, w której dominuje obecność eozynofila, to niektóre fenotypy, w tym ten związany z otyłością, mogą wynikać z dominacji granulocytów obojętnochłonnych, a ich immunopatologia wydaje się być w pewnej mierze zależna od oddziaływania hormonów zarządzających metabolizmem i łaknieniem, istotnych w patogenezie otyłości. Komórki błony mięśniowej oskrzeli stanowią mechaniczną strukturę odpowiedzialną za kontrolę szerokości światła oskrzeli. Tworzą one jednocześnie tkankę czynną immunologicznie, zdolną do reagowania na w/w hormony, jak i uwalniania cytokin prozapalnych. Są one zatem istotnym elementem immunopatologii astmy oskrzelowej, szczególnie w zakresie trwałej przebudowy oskrzeli. Stąd celem pracy Doktoranta była ocena

wpływu leptyny oraz insuliny na regulację odpowiedzi immunologicznej w przebiegu astmy, ze szczególnym uwzględnieniem komórek błony mięśniowej oskrzeli.

Wstęp

Przedstawiona do oceny rozprawa ma układ typowy i jest starannie przygotowanym maszynopisem w języku angielskim liczącym 120 stron. Praca zawiera 49 rycin oraz 6 tabel ułatwiających zrozumienie treści zawartych w dysertacji.

We wstępie Doktorant scharakteryzował immunopatologię chorób alergicznych, w tym astmy, oraz znaczenie udziału komórek mięśni gładkich oskrzeli w przewlekłym zapaleniu i przebudowie dróg oddechowych. Opisał następnie patofizjologię otyłości i zespołu metabolicznego oraz ukazał możliwy związek między rozwojem i przebiegiem zapalenia alergicznego, astmy i otyłości. Treść tego rozdziału jest wyrazem rzetelnej analizy piśmiennictwa i wskazuje na doskonałe przygotowanie merytoryczne Doktoranta do realizacji celów i opracowania niniejszej pracy. Tak dobrze opracowany wstęp stanowi świetne wprowadzenie do uzasadnienia podjęcia badań i zdefiniowania celu pracy oraz przygotowuje czytelnika do zrozumienia wyników i wniosków przedstawionych w kolejnych rozdziałach rozprawy. Jest on również podstawą prawidłowo sformułowanego uzasadnienia podjęcia badań oraz hipotezy badawczej niniejszej dysertacji.

Materiał i metody

Badania przedstawione w dysertacji mają charakter badań *in vitro*. Doktorant wykonał szereg eksperymentów na ludzkich pierwotnych komórkach mięśni gładkich oskrzeli, traktując je leptyną lub insuliną w obecności lub nie cytokin zapalnych typu Th2 (IL-4) oraz Th1 (IFN- γ). Za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (real-time PCR) oraz metody Cytometric Bead Array z udziałem cytometrii przepływowej, umożliwiającej jednoczesną ocenę wielu cytokin w jednej próbce, została zbadana ekspresja i stężenie wybranych receptorów immunologicznych oraz mediatorów stanu zapalnego. Są to podstawowe metody laboratoryjne służące do oceny niniejszych czynników. Wyniki zostały zanalizowane za pomocą właściwie dobranych metod statystycznych. Zastosowany układ eksperymentalny wraz z odpowiednimi narzędziami badawczymi oraz właściwie wykonaną analizą

statystyczna były podstawą do przeprowadzenia właściwej analizy wyników oraz wyciągnięcia prawidłowych wniosków.

Wyniki

Wyniki zostały opisane na 29 stronach; są ułożone logicznie i przedstawione w bardzo przejrzysty sposób w postaci 42 rycin. Rozdział zawiera 2 główne obszary merytoryczne opatrzone podsumowaniem wyników. W pierwszym z nich Doktorant opisał wpływ insuliny i leptyny na receptory immunologiczne na komórkach mięśni gładkich oskrzeli - również poddanych działaniu cytokin typu Th2 i Th1 - za pomocą real-time PCR. W drugim obszarze ocenił ekspresję cytokin zapalnych oraz adipokin metodą Cytometric Bead Array w takich samych układach i dokonał porównania wpływu hormonów otyłości na badane parametry bez obecności lub w obecności cytokin: IL-4 i IFN- γ . Uzyskane wyniki pozwoliły na dokonanie obserwacji wskazujących na możliwość oddziaływania hormonów otyłości na ekspresję niektórych receptorów immunologicznych, cytokin zapalnych i adipokin oraz właściwości modulujących to oddziaływanie głównie przez IL-4. Należy podkreślić, iż pieczołowite przedstawienie dużej liczby wyników oraz umieszczenie podsumowań we właściwych miejscach rozdziału znacznie ułatwiają ich całościową ocenę.

Dyskusja

Dyskusję zawartych w dysertacji wyników i analiz przeprowadził Doktorant na 8 stronach maszynopisu w sposób krytyczny, z wykorzystaniem niezwykle bogatego i aktualnego piśmiennictwa. Wykaz piśmiennictwa liczący 311 pozycji zestawiony prawidłowo został w pełni wykorzystany w tekście rozprawy. Doktorant merytorycznie uzasadnił wybór insuliny i leptyny jako istotnych hormonów zaangażowanych w patofizjologię otyłości i zespołu metabolicznego, jak również każdego z badanych parametrów immunologicznych. Dokonał analizy potencjalnego związku astmy oskrzelowej z otyłością, szczególnie uwzględniając udział komórek mięśni gładkich oskrzeli w immunopatologii przewlekłego zapalenia alergicznego. Doktorant dokonał bardzo dokładnej oceny i interpretacji wyników przeprowadzonych badań w odniesieniu do najnowszych danych literaturowych. Na szczególną uwagę zasługuje próba ustalenia zależności między oddziaływaniem hormonów otyłości, a ekspresją receptora histaminowego HR1 oraz receptora

glikokortykosteroidowego, jak również stężeniem FGF, MCP-1, IL-6 i IL-8. Czynniki te mają bowiem ogromne znaczenie - odpowiednio - w reaktywności komórek mięśni gładkich na histaminę i generowanie skurczu oskrzeli, w leczeniu astmy oskrzelowej za pomocą glikokortykosteroidów wziewnych, w procesach przebudowy dróg oddechowych czy wreszcie w rozwoju przewlekłego stanu zapalnego.

Uwagi

Z obowiązku, jaki przypada Recenzentowi, należy zwrócić uwagę na następujące kwestie: (1) mimo znacznych różnic w średnich wartościach wielu analizowanych czynników nie wykazano istotności statystycznej tych różnic; brakuje również informacji o liczbie wykonanych eksperymentów oraz liczbie n wziętej do analizy statystycznej; (2) leptyna i insulina użyte do eksperymentów były rozpuszczane w alkoholu etylowym - nie zawarto informacji czy zbadano wpływ alkoholu etylowego rozpuszczonego w medium kontrolnym w odpowiednich stężeniach na badane parametry; (3) próby wyjaśnienia wymaga kwestia, dlaczego efekt biologiczny w zakresie ekspresji mRNA niektórych badanych czynników obserwowany w 8 godzinie zanika w 24 godzinie hodowli; (4) dlaczego do badań wybrano IL-4 w stężeniu 50 ng/ml i IFN- γ w stężeniu 30 ng/ml; (5) na wykresach 27a, 28a, 29a leptyna widnieje w stężeniu wyrażonym w pmol/mL (8h), a na wykresach 27b, 28b, 29b w stężeniu wyrażonym w ng/mL; na kolejnych wykresach ukazujących wpływ insuliny stężenie wyrażone jest już tylko w pmol/mL w obu punktach czasowych.

Jednocześnie pragnę podkreślić, iż podniesione powyżej kwestie nie umniejszają wysokiej wartości dysertacji opartej o rzeczową analizę uzyskanych wyników i ich właściwą interpretację w odniesieniu do postawionej hipotezy i informacji zawartych w piśmiennictwie.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi rzetelne, wartościowe, oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe aspektów dotyczących związków między immunopatologią zapalenia alergicznego w przebiegu astmy, a otyłością i zespołem metabolicznym na przykładzie komórek mięśni gładkich oskrzeli, stanowiących czynny immunologicznie organ w układzie oddechowym. Doktorant prawidłowo zaplanował pracę, uzasadnił podstawę prowadzonych badań, właściwie sformułował założenia pracy i hipotezę

badawczą i zrealizował cele badawcze, a z uzyskanych wyników wyciągnął szereg interesujących wniosków. Istotną wartością rozprawy jest to, że stanowi ona opracowanie dokonujące tak szerokiej analizy zależności między astmą, a otyłością na poziomie immunopatologii zapalenia alergicznego i wnosi duży wkład w dotychczasową wiedzę w tym zakresie.

Dlatego uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Niniejszym przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr. Driesa Van Elsta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 10.08.2022r.

dr hab. n med. Maciej Chałubiński, prof. UM