

prof. dr hab. med. Radosław Gawlik
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,
Alergologii i Immunologii Klinicznej, SUM

Katowice 10.08.2022r.

Ocena pracy doktorskiej magistra biologii Dies van Elsta pt. „Badania mechanizmów endotypu astmy związanego 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”.

Astma jest obecnie jedną z najczęściej stwierdzanych przewlekłych chorób cywilizacyjnych i dotyczy różnych grup chorych. W ostatnich latach obserwujemy znaczne zwiększenie się częstości występowania astmy w krajach uprzemysłowionych. Według badań epidemiologicznych przeprowadzonych w Polsce (ECAP - Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce) częstość występowania astmy w populacji wzrosła do 9,3 %. Szacuje się, że na astmę choruje ok. 300 mln mieszkańców Ziemi. Wiedza wyjaśniająca patomechanizmy astmy, choć stale rozszerzana daleka jest od doskonałości. Uważamy astmę za przewlekłą chorobę zapalną układu oddechowego o podłożu immunologicznym. Zróżnicowana patofizjologia i symptomatologia schorzenia doprowadziła do wyróżnienia kilku fenotypów astmy. Jednym z nich jest astma związana z otyłością.

Fenotyp ten charakteryzuje się infiltracją dróg oddechowych przez neutrofile, częstymi zaostreniami choroby oraz gorszą odpowiedzią na terapię z wykorzystaniem wziewnych glikokortykosteroidów. Wyniki licznych badań przekrojowych i prospektywnych przeprowadzonych w grupie dorosłych osób, a także dzieci i młodzieży, wspierają hipotezę, że otyłość jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju astmy. Wiadomo też, że ryzyko otyłości u pacjentów z astmą niealergiczną jest o ok. 50% większe niż z astmą alergiczną. Dokładne mechanizmy immunologiczne propagujące stan zapalny w astmie związanej z otyłością nie są jednak dokładnie poznane. Dlatego podjęte przez Doktoranta badania są bardzo istotne z poznawczego punktu widzenia.

Praca doktorska stanowi typowe dla prac doktorskich opracowanie, liczy 120 stron w tym zawiera się: spis treści, wykaz skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, opis materiału

i metod, wyniki, dyskusja oraz wnioski. Pracę kończą streszczenia oraz spis piśmiennictwa. Praca doktorska została napisana w języku angielskim.

We wstępie pracy obejmującym 35 stron Doktorant przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zapalenia alergicznego, astmy i otyłości. Omawia mechanizmy immunologiczne, epidemiologię i najnowszą klasyfikację chorób alergicznych. Opisuje wpływ chorób alergicznych na jakość życia i koszty związane z ich leczeniem. Prezentuje możliwe ścieżki rozwoju nadwrażliwości alergicznej. Dalszy fragment poświęcony jest astmie oskrzelowej z uwzględnieniem jej fenotypów i opisu zapalenia typu 2 oraz roli mięśni gładkich dróg oddechowych. Dalsza część wstępu dedykowana jest innym powszechnym problemom zdrowotnym jakim są otyłość i zaburzenia metaboliczne. W tym podrozdziale Doktorant przedstawia ich patofizjologię, omawia szeroko współwystępowanie astmy i otyłości oraz opisuje dokładnie możliwe wspólne elementy patomechanizmu obu chorób jakimi są IL-6, TNF, IL-17, lektyna.

Treść tej części pracy jest rozległa i pozwala wprowadzić czytelnika w poruszane w dalszej części dysertacji zagadnienia.

Założenia i hipotezy robocze pracy wynikające z przedstawionego we wstępie wyvodu naukowego są sformułowane jasno i poprawnie. Obejmują one wpływ stymulacji leptyną lub insuliną na ekspresję receptorów immunomodulujących na powierzchni HBSCM oraz produkcję adipokin i licznej grupy cytokin, a także wpływ IL-4 oraz IFN- γ na zachowanie się powyższych wskaźników.

W rozdziałach materiał i metody Doktorant przedstawił dane dotyczące materiału komórkowego zastosowanego w badaniu oraz metody PCR użytej do oceny ekspresji receptorów: HR1, LEPR, INSR, IL13Ra1, IL4R, FGFa, NR3C1 oraz cytometrycznego oznaczenia adiponectin, adypsiny, retinol binding protein 4 (RBP4), MCP-1, IL-1 β , IP-10, IL-10, IL-8, leptyny, IL-6, IFN- γ , resistin, TNF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, uwalnianych przez komórki HBSCM mięśniówki gładkiej, które zostały rozmieszczone na płytkach z gęstością 30000 komórek /krążek (10 000 komórek/cm² powierzchni wzrostu) i poddane stymulacji leptyną i insuliną w różnych stężeniach. Do przeprowadzenia oznaczeń zastosowano odpowiednio: reakcję łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją oraz cytometrię przepływową.

Wyniki badania są opisane na 22 stronach. Zawierają 42 rycin przedstawiających uzyskane dane i ich analizę statystyczną. Zawierają one bogaty materiał naukowy, dobrze przeanalizowany z punktu widzenia statystyki, jak i wyróżnienia najważniejszych rezultatów. Autor zwraca uwagę na brak wpływu leptyny oraz insuliny na śmierć komórki oraz na proliferację komórek HBSMC. Analizując wpływ trzech wzrastających stężeń leptyny na ekspresję receptorów HR1, LEPR, INSR, IL13R, IL4R, FGFa, NR3C1 wykazał niezamienny wzrost ekspresji HR1 po 8 i 24 godzinach po ekspozycji na najniższe stężenie leptyny oraz jego spadek dla 200 i 1000ng/mL stężenia leptyny. Podobny efekt Doktorant obserwował w odniesieniu do ekspresji LEPR, IL13R, NR3C1 poddanej działaniu leptyny. Brak wpływu żadnego ze stężeń leptyny na ekspresję INSR, IL4R, FGFa. Analizując wpływ dwóch stężeń insuliny (50000 i 250000 pmol/ml) na ekspresję receptorów HR1, LEPR, INSR, IL13R, IL4R, FGFa, NR3C1 wykazał spadek ekspresji wszystkich powyższych receptorów po 8 godzinach za wyjątkiem dawko-zależnego wzrostu ekspresji FGFa. W przypadku HR1, IL4R, IL13R ekspresja receptorów wracała do wartości wyjściowych. Dalsze uzyskane przez Doktoranta wyniki nie wykazały synergistycznego z lektyną wpływu Il-4 na ekspresję oznaczanych receptorów za wyjątkiem znamiennego zmniejszenia ekspresji IL-13R oraz LEPR. W przypadku dodania insuliny następował spadek ekspresji IL-4R. Doktorant dokonał oznaczeń stężenia cytokin i adipokin uwalnianych przez HBSMC pod wpływem różnych rozcieńczeń leptyny i insuliny po 8 i 24 godzinach. Nie wszystkie białka udało się oznaczyć z uwagi na niskie poziomy uniemożliwiające interpretacje. Doktorant obserwował duży spadek stężenia MCP-1 po podaniu leptyny o niskim stężeniu, stopniowo rosnący wraz z dodawanymi wzrastającymi stężeniami leptyny. Poziom IL-8 w podobnych warunkach po 8 godzinach uległ zmniejszeniu, zrównując się z stężeniem kontrolnym po 24 godzinach. Stężenie IL-6 w podobnym warunkach było obniżone po 8 godzinach, zaś po 24 h było podobne do stężenia uzyskanego w kontroli, za wyjątkiem czterokrotnego wzrostu po stymulacją leptyną o stężeniu 50ng/mL. Obserwowano przyrosty stężenia MCP-1 po 8 godzinach jedynie w odpowiedzi na stymulację najwyższym stężeniem insuliny oraz spadek IL-6, IL-8 po stymulacji pozostałymi stężeniami insuliny, po 24 h stężenia normalizowały się będąc zbliżone do siebie. Po stymulacji IL-4 doktorant obserwował po 8 godzinach wzrost produkcji IL-6 i spadek IL-8 niezależnie od stężeń leptyny czy insuliny. Nie obserwował znamienych zmian wydzielania RBP-4, adypsyny i MCP-1 (choć wykazywało niższe wartości), który normalizował się po dodaniu leptyny lub insuliny. Dodanie do hodowli HBSMC INF-gamma wpłynęło na wzrost produkcji IL-6, i spadek IL-8 po stymulacji zarówno leptyną jak i insuliną.

Ta część pracy zasługuje na uznanie z uwagi na jej dużą pracowitość. Dowodzi dużych umiejętności i dojrzałości organizacyjnej doktoranta.

W dyskusji obejmującej 7 stron Autor podsumowuje i uwypukla własne wyniki oraz porównuje je do danych uzyskanych przez innych autorów. Na podstawie analizy piśmiennictwa i przeprowadzonej pracy Doktorant wskazuje na występowanie zmian w ekspresji genów dla receptorów immunologicznych oraz wydzielania wybranych cytokin przez komórki mięśni gładkich oskrzeli poddanych stymulacji fizjologicznymi i wyższymi stężeniami leptyny lub insuliny. Zarówno lektyna jak i insulina wykazują działanie hamujące, które zanika kiedy ich stężenia wzrastały do poziomów przekraczających fizjologiczne, co ma miejsce w zaburzeniach metabolicznych, otyłości.

Wnioski są w większości jasne, dobrze sformułowane i czytelne, logicznie wyprowadzone z przeprowadzonego badania naukowego.

Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i wzorowo przedstawione.

Praca zawiera także streszczenie w dwóch wersjach językowych (polskiej i angielskiej) oddające sens badania.

Z obowiązku recenzenta wśród krytycznych uwag dotyczących pracy pragnę zwrócić uwagę na niezgodności w ocenie znamienności spadku ekspresji HR1 poddanej działaniu leptyny w stężeniu 200 ng/mL określonej w tekście na str. 53 jako znamienna, zaś na wykresie 8a jako niezamienna, a także brak oznaczenia znamienności na wykresach 19, 27a, 28a.

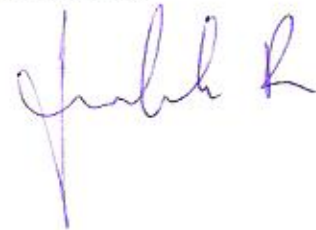
Z innych uwag chciałem zapytać o źródła wykresów na str. 19, 27, 29a, 30a, 31a, 32a, 36, 37, 41, 42, 45 (*czy opisanie w tekście jako increased massively można uznać za znamienne?*) 46, 47, 48, 49.

Powyższe uwagi, które można określić redakcyjnymi w żadnym stopniu nie umniejszają wartości przedstawionej pracy. Niewątpliwie jej dużą zaletą i wartością jest przedstawienie wspólnych powiązań immunomechanizmu zapalenia alergicznego i zaburzeń metabolicznych.

Podsumowując, praca magistra biologii Dies van Elsta pt. „Badania mechanizmów endotypu astmy związanej 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” spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i zasługuje na pozytywną ocenę. Kandydat ujawnił w niej zarówno zdolność samodzielnego prowadzenia badań

naukowych, analitycznego myślenia jak również swobodnego operowania danymi literaturowymi. 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). Dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie magistra biologii Dies van Elsta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej magistra biologii Dies van Elsta

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Julia R', is positioned to the right of the text.