

Łódź, 5 sierpnia 2022

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**„Effects of house dust mite stimulation on inflammasome activation in human bronchial epithelium in asthma after rhinovirus infection”** autorstwa mgr Urszuli Radzikowskiej

Zgodnie z uchwałą Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 26 maja 2022 zostałem wyznaczony do pełnienia obowiązków Recenzenta rozprawy doktorskiej pod tytułem „*Effects of house dust mite stimulation on inflammasome activation in human bronchial epithelium in asthma after rhinovirus infection*” autorstwa mgr Urszuli Radzikowskiej. Praca powstała w Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF) University of Zurich, oraz w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem Pani Dr hab. Mileny Sokołowskiej.

### INFORMACJE OGÓLNE

Rozprawa została przygotowana w formie monografii, w języku angielskim. Praca zawiera 123 strony i ma układ klasyczny. Podzielona została na rozdziały: *Introduction, Aims of the study, Materials and methods, Results, Discussion*. Charakterystykę grup badanych i wyniki przedstawiono w 19 tabelach. Pracę wzbogacają 36 ryciny. Całość poprzedzona jest wykazem skrótów i podsumowana streszczeniem w języku polskim i angielskim. Lista piśmiennictwa obejmuje 182 pozycji, w przeważającej większości z ostatnich 2 lat. Autorka podjęła niezwykle interesujący temat zbadania molekularnych mechanizmów interakcji pomiędzy infekcją wirusem RV, ekspozycją na roztocza kurzu domowego i infekcją SARS-CoV-2. Badania prowadzono *in vivo* - u chorych na astmę i u osób zdrowych, ponadto przeprowadzono badania na hodowlach komórkowych. Na przeprowadzenie badania z udziałem pacjentów i ochotników uzyskano zgodę odpowiednich komisji bioetycznych.

### SZCZEGÓŁOWA ANALIZA ROZPRAWY

We wstępie Doktorantka omówiła podstawowe informacje dotyczące astmy, jej epidemiologii, czynników ryzyka, symptomatologii i patofizjologii. Przedstawiła mechanizmy prowadzące do zaostrzeń, ze szczególnym uwzględnieniem synergii pomiędzy infekcją wywołaną wirusami RV i ekspozycją na roztocza kurzu domowego. Szczegółowo omówiła rolę nabłonka oskrzelowego w patogenezie astmy, zjawiska zachodzące w

komórkach nabłonka w wyniku infekcji wirusem RV, ekspozycji na roztocza kurzu domowego, mechanizmy prowadzące do aktywacji inflamasomu i jej następstwa. Doktorantka opisała również potencjalny wpływ tych zjawisk na odpowiedź przeciwwirusową w przebiegu infekcji SARS-CoV-2. Całość pracy jest bogato ilustrowana, a jakość merytoryczna i estetyczna rycin jest warta podkreślenia.

Celem głównym pracy była ocena wpływu infekcji wirusem RV, ekspozycji na roztocza kurzu domowego i infekcji SARS-CoV-2 na odpowiedź immunologiczną zachodzącą w nabłonku oskrzeli u osób zdrowych i chorych na astmę, w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*.

Cele szczegółowe to: 1. Poznanie mechanizmów aktywacji inflamasomu w komórkach nabłonka zainfekowanych wirusem RV; 2. Ocena odpowiedzi immunologicznej komórek nabłonka oskrzelowego w wyniku aktywacji inflamasomu wywołanej infekcją wirusem RV u osób zdrowych i chorych na astmę; 3. Ocena wpływu stymulacji alergenem roztoczy kurzu domowego na aktywację inflamasomu i odpowiedzi przeciwwirusowej w komórkach nabłonka u zdrowych i chorych na astmę; 4. Poznanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej zachodzących w komórkach nabłonka oskrzelowego osób zdrowych i chorych na astmę zainfekowanych wirusem SARS-CoV-2; 5. Ocena efektów złożonej ekspozycji na wirusy RV, SARS-CoV-2 i roztoczy kurzu domowego na odpowiedź immunologiczną zachodzącą w komórkach nabłonka oskrzelowego u zdrowych i chorych na astmę.

Opisana metodologia badań obejmuje badania *in vivo* z udziałem ochotników zdrowych i chorych na astmę, pochodzących z kilku kohort: kohorty SIBRO (Wrocław i Zurich) oraz kohorty A (Kraków), oraz kohorty z Imperial College London. W tej ostatniej, zastosowano metodę eksperymentalnej inokulacji wirusa RV, a następnie oceny molekularnych efektów infekcji w materiale biologicznym (popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe, popłuczyny nosowe, biopsje szczoteczkowe błony śluzowej oskrzeli). Pozostałe eksperymenty Doktorantka prowadziła stosując hodowle komórek nabłonka oskrzelowego, które stymulowano wirusem RV, alergenem HDM i wirusem SARS-CoV-2 (w warunkach koinfekcji). Zastosowano metody genetyczne (analiza transkryptomu NGS, RT-PCR), immunologiczne i proteomiczne (ELISA, *mesoscale discovery platform*, *proximity extension*

*assay, Western Blot*), mikroskopię konfokalną. Szczegółowo opisano metody analizy statystycznej.

Uzyskane wyniki Autorka opisała bardzo wyczerpująco, wszystkie wyniki zostały dodatkowo przedstawione w formie wykresów i ilustracji.

Dyskusja stanowi zwięzły i merytorycznie spójny rozdział, w którym poruszono wszystkie istotne aspekty odnoszące się do uzyskanych wyników. Wskazują one, że u chorych na astmę, eksperymentalna donosowa inokulacja wirusa RV wywołuje nadmierną i przedłużoną odpowiedź immunologiczną z udziałem inflammasomu w nabłonku oskrzeli. Badania *in vitro* wykazały, że aktywacja inflammasomu wywołana wirusem RV odbywa się za pośrednictwem RIG-I, a nie NLRP3 lub MDA5. Aktywacja inflammasomu indukowana wirusem RV powoduje przetrwałą choć nieprawidłową odpowiedź interferonową. Ekspozycja na roztocza nasila opisane nieprawidłowości w aktywacji inflammasomu poprzez RIG-I tylko u chorych na astmę, nie wpływając na te zjawiska u osób zdrowych. Doktorantka wykazała również, że wcześniejsza infekcja RV wpływa na replikację wirusa SARS-CoV-2 w nabłonku osób chorych na astmę. Jednoczesna infekcja wirusem RV i SARS-CoV-2 nabłonka oskrzeli chorych na astmę powoduje nasilenie zależnego od aktywacji inflammasomu procesu zapalnego w nabłonku oskrzeli.

#### OCENA KRYTYCZNA

Przeprowadzone badania ujawniają szczegółowe mechanizmy zapalenia u chorych na astmę. Warunki eksperymentu odzwierciedlają sytuacje zachodzące w organizmie żywym, w warunkach naturalnych u chorych na astmę, uczulonych na roztocza kurzu domowego, w sytuacji jednoczesnej stymulacji alergenami HDM i infekcji RV. Wskazują również na możliwość upośledzenia mechanizmów obronnych na poziomie komórek nabłonka oskrzelowego w warunkach jednoczesnej infekcji wirusem RV i SARS-CoV-2.

Jedyna uwaga krytyczna dotyczy niedostatecznego opisu metodologii pozyskiwania materiału i danych w części dotyczącej badania *in vivo*, czyli płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, popłuczyn nosowych, biopsji oskrzeli.

Z charakterystyki grup badanych wynika, że status uczulenia na roztocza kurzu domowego nie jest jednorodny. W grupie znajdują się chorzy, u których wykazano uczulenie

3

**Klinika Pneumonologii**  
**II Katedra Chorób Wewnętrznych**  
 Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Wojciech Jerzy Piotrowski

Ul. Kopcińskiego 22, 90 -153 Łódź  
 Tel. 42 678 75 05; Fax. 42 678 21 29  
[www.umed.pl](http://www.umed.pl)

na roztocza kurzu domowego, ale są też tacy, u których nie wykazano takiego uczulenia, a nawet u których astma nie ma charakteru atopowego. Poproszę zatem o komentarz, czy takie zróżnicowanie grupy badanej mogłoby wpłynąć na interpretacje uzyskanych wyników.

Nie są to krytyczne uchybienia i w żaden sposób nie wpływają na wysoką ocenę pracy.

Wstęp jest bardzo merytoryczny i zwięzły, zawiera niezbędne informacje wprowadzające w zagadnienie. Zastosowano bardzo nowoczesne metody badawcze, adekwatne do realizacji zaplanowanych celów. Cele sformułowano w sposób jasny i czytelny. Opis uzyskanych wyników jest bardzo szczegółowy, bogato ilustrowany i uzupełniony dodatkowymi tabelami. Dyskusja również stanowi wartościową część rozprawy. Szczególnie doceniam zwięzłość języka. Dyskusja jest dobrym przykładem zastosowania zasad medycyny translacyjnej.

#### PODSUMOWANIE

Recenzowaną pracę doktorską uważam za niezwykle wartościową. Cele zostały sformułowane w sposób jasny, a praca została zaplanowana i wykonana poprawnie. Zastosowano nowoczesne metody badawcze. Zastosowano odpowiednie metody statystyczne. Sformułowane wnioski są w pełni uzasadnione.

#### WNIOSEK

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.

Wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Urszuli Radzikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną wnoszę również o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. med. Wojciech Piotrowski