UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. nadzw. UJ
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 29 września 2016 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kamila Krzysztofa Grubczaka

pt. „Badania dośiadczalne nad zastosowaniem witaminy D3 jako czynnika modulującego fenotyp i funkcję monocytów z ekspresją CD16"

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Marcina Moniuszko

w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku

Astma stanowi obecnie jedną z najczęstszych chorób na świecie, dotykającą ponad 300 milionów ludzi, w szczególności w krajach wysokorozwiniętych, w których znamiennie częściej spotyka się czynniki sprzyjające rozwojowi tej choroby. Choroba ta dotyka zarówno pacjentów dorosłych, jak i dzieci, co stanowi istotny problem kliniczny. Astma jest chorobą o charakterze zapalnym, w której zaangażowane są zaktywowane komórki immunokompetentne zarówno należące do komponenty wrodzonej, jak i nabytej układu immunologicznego. Szereg czynnków prozapalnych wydzielanych przez komórki układu odporności, bierze udział w postępującym uszkodzeniu i niekorzystnej przebudowie struktur układu oddechowego, prowadzących do rozwoju objawów klinicznych tej choroby.

Jednym z typów komórek układu immunologicznego biorącym udział w rozwoju astmy są monocyty, będące ważnym ogniwem wiążącym gałąź wrodzoną i nabytą odpowiedzi immunologicznej, stając się przez to także istotnym ogniwem w rowoju tej choroby. Badania ostatnich lat wskazują, że monocyty są heterogenną populacją komórek, w której wyróżnia się subpopulacje o różnej reaktywności oraz funkcji, a które definiowane są na podstawie stopnia ekspresji dwóch ważnych antygenów klasyfikacyjnych: CD14 oraz CD16. Zgodonie z obecnie przyjętą wiedzą wyróżnia się trzy populacje monocytów: 1) klasyczne - z wysoką ekspresją CD14, ale nie wykazujące ekspresji CD16 (CD14++/CD16-), 2) pośrednie - również wykazujące wysoką ekspresję CD14, ale również ekspresję antygenu CD16 (CD14++/CD16+) oraz 3) nieklasyczne – monocyty o niskiej ekspresji CD14 i

email: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl
Tel.: 012-664-61-80
Fax: 012-664-69-02

wysokiej CD16 (CD14+/CD16++). Rola tych trzech populacji oraz ich metabolitów w rozwoju astmy są już od lat badane w celu m.in. możliwości opracowania nowych strategii modulowania ich funkcji, co ograniczałoby rozwój tej choroby. Jednakże stanowi to wciąż poważne wyzwanie badawcze, a potencjalne strategie hamowania aktywacji monocytów w astmie z zastosowaniem wybranych czynników farmakologicznych, wciąż wymaga dalszych badań.

Lekami farmakologicznymi pierwszgo wyboru w leczeniu astmy są preparaty oparte o glikokortykosteroidy (GKS), mające ogólne działanie immunosupresyjne na wszystkie komponenty komórkowe i humoralne odpowiedzi immunologicznej. Stosowanie tych leków w sposób długotrwały, co jest typowe w przypadku leczenia astmy, wiąże się jednak z szeregiem poważnych skutków nieporządanych, których wystąpienie jest szczególnie niekorzystne w przypadku pacjentów pediatrycznych. Dodatkowym problemem jest występowanie tzw. steroidooporności u niektórych pacjentów, której wynikiem jest brak lub niska skuteczność stosowanych preparatów GKS w leczeniu astmy. Istnije zatem ciągła potrzeba opracowywania nowych leków oraz zwiększania efektywności działania już znanych preparatów steroidowych, w tym poprzez stosowanie ich w terapii skojarzonej z innymi preparatami.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wpisuje się w całości w przedstawione wyżej wyzwania badawcze i kliniczne. W swojej pracy doktorant podjął ważną próbę oceny wpływu preparatów opartych o aktywną formę witaminy D (kalcitrolu; wit. D3) na efektywność leków z grupy GKS, w odnesieniu do ich działania na populację monocytów u osób chorych na astmę. Doktorant zbadał również wpływ aktywnej formy witaminy D na różne subpopulacje monocytów u tych pacjentów, w szczególności z ekspresją antygenu CD16.

Formalny opis rozprawy i ocena edytorska

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 94 strony i zachowuje typowy układ rozprawy doktorskiej. *Wstęp*, od którego rozpoczyna się praca, liczy 30 stron i zawiera informacje odnośnie epidemiologii i leczenia astmy oraz roli poszczególnych elementów układu odporności w rozwoju tej choroby, a także roli witaminy D, jako regulatora odpowiedzi immunologicznej. Wstęp jest zaopatrzony 6-oma starannymi i informatywnymi rycinami. Po nim następuje zwięzłe przedstawienie *Założeń i celów pracy* oraz 10-o stronicowy rozdział *Materiały i metodyka badań*, w którym doktorant opisuje materiał badawczy oraz przebieg poszczególnych doświadczeń, które przeprowadzał w czasie swoich badań. Rozdział zawiera także 5 rycin oraz jedną tabelę chrakteryzującą grupę pacjentów i osób kontrolnych będących dawcami materiału badawczego.

Kolejny rozdział *Wyniki* liczy 22 strony i obejmuje opis najważniejszych wyników uzyskanych przez doktoranta, które zostały zilustrowane na 17-u informatywnych rycinach. W rozdziale *Dyskusja,* który liczy 8 stron,

doktorant zwięźle omawia wyniki swoich badań w odniesieniu do dotychczasowego stanu wiedzy światowej, odwołując się do 170-u pozycji literaturowych, które zostały przytoczone na końcu rozprawy w rozdziale *Piśmiennictwo*. Pracę kończy 1-o stronicowy rozdział *Wnioski* oraz 1-o stronicowe *Streszczenie* pracy, po którym następuje również krótkie streszczenie w języku angielskim (1-o stronicowy *Abstract*).

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska zawiera wszystkie części formalne przewidziane dla prac doktorskich i spełnia wymogi formalne takiej rozprawy.

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana starannie. W czasie czytania zwracają uwagę drobne błędy interpunkcyjne oraz stylistyczne – gł. braki przecinków w odpowiednich miejscach zdań złożonych oraz niepotrzebne spacje. W niektórych miejscach, szczególnie *Wstępu*, daje się zauważyć brak stosownych pojedynczych cytowań dla źródeł przedstawianych informacji. Zauważa się rownież stosowanie sporadycznie słownictwa żargonowego w miejsce terminów naukowych, np. „podziurawienie błony komórkowej", które należałoby raczej zapisać, jako np. „naruszenie przepuszczalności błony komórkowej".
Tabele i ryciny – szczególnie własne schematy umieszczone we *Wstępie*, zostały przygotowane w sposób bardzo staranny, a poniżej przedstawione uwagi nie umniejszają pozytywnej oceny edytorskiej strony rozprawy.

Uwagi do części edytorskiej:

1. Wykresy z cytometrii przepływowej (dot-ploty) umieszczone na niektórych rycinach – np. Ryc. 9 we *Wstępie*, a także Ryc. 12 i 14 w rozdziale *Wyniki*, zostały zwężone bez zachowania ich proporcji rozmiarów. Chociaż nie wpływa to na wynik ilościowy prezentowany na wykresie liczbowym, w znaczny sposób ogranicza jednak rozdzielczość i widoczność populacji na takim wykresie (szczególnie w osi X).

   Tego typu zmiany wielkości i proporcji wykresu cytometrycznego, choć nie wpływają na prezentowany wynik, znacznie utrudniają czytelnikowi ocenę strategii bramkowania, przyjętą przez doktoranta do identyfikacji poszczególnych subpopulacji monocytów oraz interpretację uzyskanych wyników.
2. Umieszczenie *Streszczenia* pracy oraz abstraktu w j. angielskim na początku rozprawy, przed rozdziałem Wstęp, byłoby w mojej ocenie bardziej informatywne. by zachować ciągłość typowych części rozprawy doktorskiej.
3. Doktorant w opisie wyników używa osoby 1-ej liczby mnogiej odnośnie autorstwa wyników (np. uzyskaliśmy, stwierdziliśmy, itp.), podczas gdy w przypadku rozprawy doktorskiej stosownym byłoby stosowanie osoby 1-szej liczby pojedynczej (np. uzyskałem, stwierdziłem, itp.). Nie umniejszając roli promotora w powstawaniu pracy doktorskiej, jest to jednak praca własna i samodzielna doktoranta, którą opisuje on w swojej dyzertacji doktorskiej.

Ocena merytoryczna

We *Wstępie* doktorant w sposób bardzo dokładny i staranny przedstawił zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie celów pracy oraz części eksperymentalnej rozprawy.

W pierszej części doktorant w sposób obszerny i systematyczny omawia zagadnienia dotyczące aspektów klinicznych związanych z rozwojem i przebiegiem astmy, jak również przytacza dane epidemiologiczne. Następną część *Wstępu* doktorant poświęca omówieniu roli poszczególnych składowych układu immunologicznego w rozwoju i przebiegu astmy, w tym subpopulacji granulocytów i limfocytów oraz ich pośredniemu i bezpośredniemu oddziaływaniu na komórki budujące dolne drogi oddechowe – w tym komórki nabłonka oskrzelowego i mięśni gładkich – które prowadzą do niekorzystnej przebudowy tkanki płucnej. Ta część *Wstępu* jest bardzo dobrze zilustrowana stosownymi rycinami - w tym Ryc. 3 podsumowującą udział głównych komórkowych składowych biorących udział w rozwoju astmy.

W kolejnej części *Wstępu*, doktorant poświęca swoją uwagę udziałowi monocytów w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Szczegółowo omawia podział monocytów na 3 subpopulacje w oparciu o ekspresję antygenów CD14 i CD16, opisując również różnice funkcjonalne znane już dla tych trzech frakcji monocytów. Tę część ilustruje także przykładami własnych opublikowanych juz wyników badań - przedstawionych na Rycinie 4. Następnie doktorant opisuje udział monocytów w rozwoju astmy wskazując na czynniki m.in. o charakterze humoralnym, jakie mogą być zaanagażowane w ten proces, które ilustruje również stosowaną Ryciną 6. W następnej części doktorant płynnie przechodzi do szczegółowego omówienia roli poszczególnych cytokin oraz chemokin wydzielanych przez monocyty oraz inne zaktywowane komórki immunokompetentne, w rozwoju astmy, wskazując na udział w tych procesach m.in. IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, IL-20 oraz TNF-α oraz szeregu chemokin wydzielanych przez limfocyty T.

W następnej części *Wstępu* doktorant omawia strategie terapeutyczne stosowane obecnie w leczeniu astmy, zwracając szczególnie uwagę na glikokortykosteroidy (GKS), podkreślając również skutki uboczne tych leków u pacjentów nimi leczonych. Omawia także aspekt steroidoodporności, jako problemu skutkującego brakiem efektów leczenia preparatami GKS u niektórych pacjentów. W tym kontekście, doktorant przedstawia dalej aktywną formę witaminy D (t.j. witaminę D3 lub kalcytriol), jako potencjalną istotną substancję o charakterze immunomodulacyjnym, którą moża potencjalnie wykorzystać w terapii chorób o podłożu zaplanym, w tym astmy. Doktorant wskazuje także na potencjalne znaczenie witaminy D w modulowaniu działania GKS na komórki układu immunologicznego, co można byłoby w sposób praktyczny wykorzystać w leczeniu chorób zapalnych. Doktorant logicznie prowadzi czytelnika do uzasadnienia potencjalnego wykorzystania takiej łączonej strategii wykorzystujacej leki z grupy GKS w skojatrzeniu z aktywną formą wit. D3 w modulowaniu monocytów u pacjentów astmatycznych, co wymaga jednak dalszych badań – objętych m.in. niniejszą rozprawą doktorską.

Podsumowując, *Wstęp* stanowi bardzo dobre i pełne wprowadzenie do dalszych badań eksperymentalnych prowadzonych przez doktoranta oraz uzasadnia podjęte w pracy cele badawcze.

Uwagi do *Wstępu*:

1) Na stronie 13, doktorant wymienia antygen CD105, jako cząsteczkę adhezyjną występującą na monocytach. Tymczasem CD105 nie jest adhezyną, ale jest ważnym receptorem cytokinowym – m.in. dla TGF-β1. Ta pomyłka skłania mnie do zadnia pytania doktorantowi: Czy obecność receptora CD105 oraz jego liganda (TGF-β1) w szeroko pojętym środowisku astmatycznej tkanki płucnej, może mieć również udział w rozwoju astmy? Czy doktoratowi znany jest potencjalny udział czynnika TGF-β1 w procesach komórkowych towarzyszących astmie?

2) Na Rycinie 6, na stronie 17, doktorant ilustruje dojrzewanie i szlaki wędrówki monocytów z krwi obwodowej do tkanki płucnej oraz ich przekształcenie w makrofagi tkankowe. Na tej rycinie doktorant umieszcza także pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, czyli EVs (nazywane przez doktoranta egzosomami), jako jeden z elementów biorących udział w tych procesach. Ten bardzo ciekawy aspekt nie jest jednak opisany w tekście.
Czy doktorant może krótko wyjaśnić jaki udział w procesach migracji lub dojrzewania makrofagów płucnych mogą mieć EVs wydzielane przez różne komórki obecne w płucach? Czy wiadomo coś doktorantowi na temat udziału EVs wydzielanych przez komórki obecne w tkance płucnej u pacjentów z astmą, w rozwoju tej choroby?

Założenia i cele pracy sformułowane są jasno i zostały prawidłowo przedstawione i uzasadnione w kontekście wiedzy oraz problemów omówionych we Wstępie.

W sekcji *Materiał i metodyka badań* doktorant w sposób zwięzły omawia materiał badawczy oraz metody stosowane na etapie jego badań.
Opisał grupę pacjentów z astmą i grupę osób kontrolnych, które włączono do badań, w tym podał charakterystykę tych osób pod względem płci i wieku. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od 9-u chorych z astmą oraz 48-u zdrowych dawców. Z krwi pozyskiwano następnie komórki jednojądrzaste (KJ), obejmujące m.in. monocyty, które wykorzystywano do dalszych badań.
W swoich badaniach doktorant wykorzystał metody zarówno hodowli komórkowej *in vitro*, jak i cytometrii przepływowej, w której badał m.in. zawartość subpopulacji monocytarnych oraz ich ich wybrane aspekty funkcjonalne w różnych układach eksperymentalnych. Opis stosowanych metod jest zwięzły, ale wystarczający do powtórzenia opisywanych doświadczeń. Rozdział ten został także zaopatrzony stosownymi rycinami przedstawiającymi m.in. sposób bramkowania i analizy cytometrycznej w celu identyfikacji poszukiwanych subpopulacji komórkowych.

Uwagi do rozdziału *Materiał i metodyka badań:*

1. Co doktorant rozumie pod pojęciem „dobra kontrola astmy" podając je jako kryterium doboru pacjentów z astmą, włączonych do badań? Czy podane przez doktoranta kryteria mogły stanowić element limitujący liczbę pacjentów włączonych do badania? Ponieważ liczba pacjentów z astmą liczyła 9 osób, należałoby dodać informację, czy było to wynikiem któregoś z kryteriów kwalifikacji do badań.

2. Warunki hodowli KJ oraz schematy ich traktowania różnymi czynnikami, związkami chemicznymi lub lekami *in vitro* (przedstawione na str. 37-38) są nieco mało jasne. Byłoby przejrzyściej umieścić je np. w tabeli lub na prostych schematach, gdzie byłoby przedstawione, który związek lub lek był dodawany do hodowli, na którym etapie eksperymentów. Ułatwiłoby to znacznie późniejszą interpretację wyników. Myślę, że doktorant będzie miał okazję przedstawić takic schemat w czasie swojej prezentacji w czasie obrony.

3. Przy opisie stosowanych przeciwciał należałoby raczej podać ilość zastosowanego odczynnika w µg na 1 ml próbki lub na daną liczbę barwionych komórek. Sama liczba µl odczynnika użyta do barwienia, bez podania np. jego wyjściowej koncentracji, nie jest wystarczająco informatywna.

4. Zastrzeżenie budzi nieco schemat bramkowania komórek TNF-α-pozytywnych na histogramie przedstawionym na Rycinie 11. W mojej ocenie, lepszym podejściem byłoby bramkowanie tych komórek na dot-plocie – np. zgodnie z tą strategią, którą doktorant zaproponował na Rycinie 9, gdzie populacja komórek TNF-α-pozytywnych jest lepiej widoczna. Którą strategię stosował doktorant przy analizie danych?

W rozdziale *Wyniki* doktorant przedstawił główne osiągnięcia swoich badań. Wyniki są opisane w sposób zrozumiały oraz zostały zilustrowane stosownymi informatywnymi rycinami, opatrzonymi odpowiednimi opisami oraz analizami statystycznymi.

Uwagi:

1. Uwaga ogólna do całego rozdziału *Wyniki*:

Opisując wyniki, doktorant stosuje termin „stymulacja" w znaczeniu „traktowanie" komórek różnymi związkami, lekami i inhibitorami, co utrudnia momentami interpretację wyników. Czytając opis wyników, w niektórych podrozdziałach trudno jest jednoznacznie ustalić, czy np. KJ były wcześniej stymulowane np. LPS, czy jedynie traktowane np. wit. D3 lub/ i MP i innymi związkami.

Słowo „stymulacja" – szczególnie w odniesieniu do komórek immunokompetentnych – nie powinno być używane w znaczeniu słowa „traktowanie". Czy doktorant rzeczywiście stymulował odpowiedź immunologiczną limfocytów i/ lub monocytów obecnych we frakcji KJ, dodając np. pochodnych witaminy D lub

GKS? Jeśli nie było to celem, to w przypadku podawania tych związków do hodowli KJ, powinno się raczej stosować termin „traktowanie" komórek, a słowo „stymulowane" pozotawić dla rzeczywistych aktywatorów komórek immunokompetentnych (np. LPS).

W pierwszej części rozdziału doktorant opisuje wpływ aktywnej formy witaminy D na zawartośc procentową subpopulacji monocytów z ekspresją CD16 u zdrowych dawców. Doktorantowi udało się ustalić, że traktowanie KJ zarówno aktywną wit. D3, jak i metyloprednizolonem (MP) zmniejsza odsetek monocytów CD16+, wskazując na immunosupresyjne działanie obu związków. Co istotne, w przypadku zastosowania obu związków jednocześnie, zaobserwowano efekt addytywny i dodatkowe obniżenie odsetka subpopulacji monocytów CD16+ w porównaniu do zastosowania tych związków osobno (Ryc. 12 i 13).
Podobnie, w przypadku komórek uzyskanych od pacjentów z astmą, zastosowanie obu związków jednocześnie, znacznie efektywniej obniżało odestek monocytów CD16+ (Ryc. 14), potwierdzając skuteczność aktywnej pochodnej witaminy D do zwiększania efektywności immunosupresyjnej metyloprednizolonu.
Jednocześnie doktorant ustalił, że zaobserwowane zmiany w odsetku monocytów CD16+ były mniej widoczne w grupie pacjentów z astmą, co może wskazywać na niższą reaktywność komórek od pacjentów na stosowane leki sterydowe, w tym preparaty GKS. Jednakże istotny statystycznie spadek odsetka monocytów CD16+ po traktowaniu komórek pacjentów z astmą metyloprednizolonem z skojarzeniu z wit. D3, wskazuje na uzasadnione nadzieje zastosowania tej pochodnej witaminy D w zwiększaniu efektu immunosupresyjnego leków stosowanych u tych pacjentów.

Uwagi:

2. Doktorant zaobserwował w swoich badaniach ważne zjawisko spadku odsetka monocytów CD16+ po traktowaniu KJ witaminą D3 i MP, co może świadczyć o aktywności immunosupresyjnej tych związków. Jednocześnie jednak z przedstawionych wykresów cytometrycznych wynika, że po takim traktowaniu KJ, zwiększał się odsetek subpopulacji monocytów klasycznych (CD16-) – szczególnie w próbkach, które traktowano wit. D3. Efekt ten był widoczny zarówno w przypadku komórek od zdrowych dawców, jak i pacjentów z astmą.
Tu pojawia się ciekawość i pytanie recenzenta, pomimo iż praca doktorska jest poświęcona subpopulacjom monocytów CD16+ (przejściowym i nieklasycznym): Jak doktorant może wytłumaczyć wzrost odsetka populacji monocytów klasycznych? Czy według doktoranta wzrost odsetka tej populacji lub szerzej – zmiana stosunku populacji monocytów CD16- do CD16+ może mieć ogólnie potencjale znaczenie w rozwoju odpowiedzi immunologicznej, a w szczeglności u pacjentów z astmą?
Jest to bardzo ciekawa obserwacja, która w mojej ocenie mogłaby stanowić w przyszłości nowy ciekawy problem badawczy.

W kolejnym etapie doktorant zbadał wpływ wit. D3 oraz MP na żywotność i aktywację procesu apoptozy w monocytach. Doktorant nie zaobserwował znaczącej zmiany w zawartości komórek wykazujących barwienie 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD), co świadczyłoby o postępującej nekrozie lub późnej apoptozie tych komórek (Ryc 17). Jednakże zastosowanie inhibitora kaspaz (VAD) - blokującego wczesne etapy procesu apoptozy, znosiło obserwowany wcześniej efekt obniżenia odsetka monocytów nieklasycznych (CD16++) na skutek działania wit. D3 (Ryc. 18). Może to wskazywać, że poziom tej populacji może być regulowany przez pochodne wit. D na skutek aktywacji procesów apoptozy w monocytach. Podobny efekt doktorant obserwował w przypadku zablokowania receptora dla GKS z zastosowaniem jego antagonisty – mifepristonu (MP), w którego obecności nie obserwował efektu obniżenia odestka monocytów nieklasycznych (CD16++) po traktowaniu witaminą D3. Może to świadczyć o zaangażowaniu wit. D3 w regulacji tego receptora.
Jednakże, co ciekawe, doktorant zaobserwował przeciwne efekty działania witaminy D3 – w obecności zarówno VAD, jak i MP - w przypadku subpopulacji monocytów przejściowych (CD16+).

Uwagi:

3. Tu pojawia się pytanie, czy w eksperymentach z anatagonistą receptora GKS, stosowane było równocześnie (lub zaraz po zablokowaniu receptora) traktowanie komórek metyloprednizolonem, będącym właściwym ligandem efektorowym dla tego receptora?
Czym doktorant tłumaczy efekt obniżenia monocytów nieklasycznych CD16++ po traktowaniu wit. D3 w obecności zablokowania receptora dla GKS? Czy opisano już w literaturze związek pomiędzy wit. D3, a recpetorem dla GKS?

4. Czy doktorant znalazł już potencjalną odpowiedź na pytanie, dlaczego obeserwuje odmienny efekt działania witaminy D3 - w obecności zarówno VAD, jak i MF – w przypadku monocytów pośrednich (CD16+)?
Czy doktorant badał np. poziom receptora dla witaminy D3 (receptora VDR) w obu subpopulacjach? Czy obserwowana różnica w odpowiedzi obu subpopulacji monocytów, może w opinii doktoranta potencjalnie zależeć od poziomu i/ lub aktywności tego receptora w obu frakcjacch monocytów?

Uwaga i sugestia ogólna recenzenta: W mojej opinii, byłoby bardzo ciekawym zbadanie w/w efektów na oczyszczonych, tj. wysortowanych subpopulacjach monocytarnych, co może stanowić ciekawą kontynuację badań przedstawionych w niniejszej rozprawie oraz może dostarczyć dokładniejszych odpowiedzi odnośnie mechanizmów immunosupresyjnego działania witaminy D3 na monocyty.

W dalszych badaniach doktorant zaobserwował również ciekawy efekt immunosupresyjny wit. D3 na reaktywne monocyty zarówno pośrednie (CD16+), jak i nieklasyczne (CD16++) produkujące TNF-α, stymulowane wcześniej LPS lub agonistą receptora TLR3. Doktorant obserwował niższy odsetek obu subpopulacji produkujących TNF-α po zastosowaniu wit. D3, potwierdzając jej immunosupresyjne działanie

(Ryc. 20 i 21). Niestety, co ciekawe, doktorant zaobserwował także spadek subpopulacji monocytów produkujacych immunosupresyjną IL-10, po traktowaniu wit. D3 (Ryc. 23).

Uwagi:

5. Tu pojawia się znów pytanie: Który z tych dwóch efektów witaminy D3 - na produkcję TNF-α i IL-10, może mieć istotniejsze znaczenie dla zahamowani rozwoju astmy? Czy doktorant badał całkowitą ilość TNF-α i IL-10 wydzielanych w hodowli KJ poddanych działaniu wit. D3? Być może wiedza odnośnie poziomu obu cytokin produkowanych całkowicie w hodowli KJ mogłaby odpowiedzieć również na to pytanie, które doktorant podejmuje równiez w swojej dyskusji?

Najistotniejsze z punktu widzenia przyszłych aplikacji praktycznych, było wykazanie przez doktoranta w ostanim etapie jego pracy, że zastosowanie aktywnej formy wit. D3 równocześnie z metyloprednizolonem, pozwala na 5-o krotne obniżenie jego dawki, w celu osiągnięcia efektu immunosupresyjnego.
Obserwowany efekt immunosupresyjnego współdziałania witaminy D3 oraz MP, doktorant wykazał zarówno w monocytach zdrowych dawców, jak również co istotne, w komórkach pobranych od astmatyków (Ryc. 24-27), Uzayskane wyniki pozwalają mieć nadzieję na potencjalne przyszłe zastosowania witaminy D3 w skojarzeniu z innymi lekami immunosupresyjnymi w leczeniu astmy.

W rozdziale *Dyskusja* autor krytycznie i ostrożnie przedstawia własne wyniki na tle danych literaturowych. Dyskusja jest napisana w sposób dojrzały, w odniesieniu do piśmiennictwa światowego. Rozprawę kończy rozdział *Wnioski*, gdzie doktorant przedstawił główne osiągnięcia swojej pracy doktorskiej oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Konkluzje są sformułowane właściwie w kontekście otrzymanych wyników.

Reasumując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej autor przeanalizował w różnych układach eksperymentalnych wpływ aktywnej formy witaminy D3 (kalcytriolu) na frakcje monocytów z ekspresją antygenu CD16 (czyli monocytów pośrednich i nieklasycznych), biorących m.in. udział w rozwoju astmy.
Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować pozytywnie na przyszłość, odnośnie potencjalnych zastosowań aktywnych pochodnych witaminy D w skojarzeniu z lekami steroidowymi, w szeroko pojętych terapiach immunosupresyjnych, w tym u pacjentów z astmą. Tego typu nowe podejście farmakologiczne pozwoli - w świetle uzyskanych wyników - na obniżenie efektywnych dawek leków steroidowych, koniecznych dla zahamowania postępów choroby, co może przełożyć się praktycznie na obniżenie wystąpienia skutków ubocznych obserwowanych przy długotrwałym stosowaniu leków steroidowych.
W związku z powyższym niniejsza praca doktorska posiada niezwykle ważny walor praktyczny i może mieć realne przełożenie na nowe podejścia terapeutyczne u chorych z astmą. Co więcej, przedstawione badania

mają również ważny aspekt poznawczy i stanowią interesujący wstęp do potencjalnych dalszych badań nad funkcjami biologicznymi różnych subpopulacji monocytów oraz nad mechanizmami umożliwiającymi modulowanie tych funkcji.

Praca doktorska stanowi oryginalny wkład doktoranta w wiedzę na temat farmakologicznego regulowania poziomu reaktywnych subpopulacji monocytów, a badania objęte pracą doktorską stanowią istotny krok w optymalizacji nowych podejść farmakologicznych w leczeniu astmy.

Przedstawione w recenzji powyższe uwagi, w tym uwagi krytyczne oraz pytania merytoryczne, w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że praca ma istotny walor poznawczy i praktyczny, a uzyskane wyniki są zachętą do stawiania wielu nowych pytań.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Kamila Grubczaka oceniam bardzo wysoko. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o dopuszczenie Pana mgr Kamila Grubczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

(Ewa Zuba-Surma)