Recenzja pracy doktorskiej mgr Kamila Krzysztofa Grubczaka

Z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji

Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marcina Moniuszki

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

Badania epidemiologiczne wskazują na wzrost liczby pacjentów leczonych z powodu astmy i chorób alergicznych w większości krajów świata. Dodatkowo rośnie liczba chorych na ciężkie postaci tych schorzeń, w tym zagrażające życiu reakcje anafilaktyczne, astmę sterydooporną. Istnieje wiele teorii wskazujących na etiologię tego zjawiska, od teorii higienicznej, poprzez zwiększone narażenie na czynniki chemiczne w środowisku, zmianę diety, stosowanie leków w tym antybiotyków, niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Niewątpliwie jednym z elementów różniących nas od naszych przodków może być spędzanie przez nas większości czasu w pomieszczeniach zamkniętych z ograniczonym dostępem promieniowania słonecznego. Nasi dziadkowie i pradziadkowie w większości pracowali na roli i poza krótkimi okresami zimowymi zmniejszone stężenie witaminy D było w tej populacji prawdopodobnie rzadkie. Jak ważny jest to czynnik świadczy choćby zróżnicowanie koloru skóry naszych przodków wynikające z szerokości geograficznej, na której żyli. Podstawą leczenia chorób alergicznych jest stosowanie glikokortykosteroidów. Przewlekłe stosowanie tych leków w formie doustnej może prowadzić do wielu działań niepożądanych, w tym osteoporozy. Badania farmakologiczne nad możliwością zmniejszenia dawek glikokortykosteroidów lub zastąpienia tych leków doprowadziły do powstania nowych leków biologicznych stosowanych u najciężej chorych osób. Dalsze badania nad innymi sposobami leczenia mogącymi poprawić skuteczność i bezpieczeństwo leczenia astmy i chorób alergicznych należą głównych wyzwań farmakologii, o czym świadczy choćby liczba prowadzonych obecnie badań klinicznych.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje uważam, że wybór tematu rozprawy doktorskiej przez Pana mgr Kamila Krzysztofa Grubczaka jest ważny i uzasadniony.

Przedstawiona mojej ocenie praca obejmuje 94 strony maszynopisu, 27 rycin. Autor cytuje 170 pozycji piśmiennictwa. Praca ma typowy układ dla prac doktorskich i składa się z spisu treści, wstępu, założeń pracy, celów, materiału i metod, wyników badań, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim.

W części teoretycznej autor opisuje epidemiologię astmy, rolę poszczególnych komórek biorących udział w jej patofizjologii. Szeroko opisuje funkcję i fenotypy monocytów (klasyczne, nieklasyczne i pośrednie) zaangażowanych w patofizjologię astmy. Opisuje rolę cytokin w mechanizmie immunologicznym astmy. Ta część wstępu wskazuje na szeroką wiedzę doktoranta dotyczącą najnowszych osiągnięć immunologii. Opisując najnowsze strategie leczenia astmy, zjawisko steroidooporności, a także rolę witaminy D w astmie i chorobach zapalnych szeroko korzysta z warsztatu nauk podstawowych. Opisuje również możliwości modulowania funkcji monocytów i ich możliwe zastosowanie w leczeniu astmy i alergii

Na podstawie problemów przedstawionych we wstępie autor sformułował cele pracy, którymi były:

„Ocena potencjału aktywnej formy witaminy D w regulacji zmian w obrębie subpopulacji monocytów z ekspresją CD16 – komórek pełniących istotną rolę w patogenezie wielu chorób o podłożu zapalnym, w tym astmy. Ponadto podjęte działania pozwolą na ustalenie na poziomie komórkowym efektów działania powszechnie stosowanych w leczeniu astmy GKS w połączeniu z aktywną biologicznie formą witaminy D".

Metodologia pracy prowadzona była z użyciem nowoczesnych metod, a stopniowy sposób dochodzenia do poszczególnych wyników pracy świadczy o metodycznym i planowym prowadzeniu badania.

Badania prowadzone były w grupie 9 chorych na dobrze kontrolowaną astmę (postać łagodna lub umiarkowana) leczonych glikokortykosteroidami oraz długodziałającymi agonistami receptora β2-adrenergicznego. Badani byli pacjentami Kliniki Alergologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu w Białymstoku. Dodatkowo zbadano 48 zdrowych, ochotników dobranych pod względem płci i wieku. Badania zostały przeprowadzono na podstawie zgody wydanej przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i protokołu: R-I-002/516/2014 oraz R-I-002/437/2010.

Metodologia badania składała się z kilku etapów. Pierwszym była izolacja komórek jednojądrowych z krwi obwodowej, hodowla limfocytów i monocytów poddanych działaniu 1 μM lub 0.2 μM metyloprednizolonu i/lub 100 nM 1,25-$(OH)_2D_3$, przygotowanie i analiza cytometryczna, badanie produkcji cytokin. Dodatkowo w badaniach zastosowano inhibitory kaspaz, stymulacje agonistami receptorów Toll-like 4, CD 14, lilopolisacharydem.

Analizę statystyczną wykonano programem GraphPad Prism 5 z użyciem testu t-Studenta lub testu Wilcoxona (przy braku rozkładu normalnego badanej cechy). Część matematyczna pracy jest dobrze zaprojektowana i przeprowadzona.

Wyniki badań mgr Kamila Grubczaka potwierdziły wpływ metyloprednizolonu i 1,25-$(OH)_2D_3$ na obniżenie populacji monocytów nieklasycznych i pośrednich oraz addytywny wpływ tych związków. Stwierdzono różnicę w odpowiedzi na leki u chorych na astmę w stosunku do grupy kontrolnej polegającą na braku odpowiedzi monocytów pośrednich przy stymulacji jedynie glikokortykosteridem i witaminą D3. Dopiero łączne stosowanie leków zmieniło odsetek badanych komórek. Podobny wpływ miało stosowanie badanych preparatów na żywotność, apoptozę monocytów. Oceniono wpływ stymulacji 1,25-$(OH)_2D_3$ na wydzielanie TNF-alfa, IL-10.

Bardzo ważnym wynikiem pracy jest wykazanie możliwości zmniejszenia dawek glikokortykosteroidów po dołączeniu do leczenia 1,25-$(OH)_2D_3$

Pracę podsumowuje dyskusja świadcząca o umiejętności swobodnego wykorzystania informacji zawartych w publikacjach naukowych. Autor analizuje znaczenie wyników, ich wiarygodność, wyniki podobnych prac, w tym badań klinicznych oraz publikacji opartych na modelu komórkowym i zwierzęcym. W dyskusji doktorant odnosi się do znaczenia

wyników niniejszej pracy i innych prac ośrodka białostockiego wskazujących na " związek pomiędzy rosnącymi wartościami stężeń witaminy D w surowicy (kalcydiol) a spadkiem produkcji TNF-α przez całkowitą pulę komórek jednojądrzastych" oraz „zdolność GKS do wybiórczego redukowania subpopulacji monocytów z ekspresją CD16 u pacjentów z astmą". W opinii autora, z czym trudno się nie zgodzić, jest istotne znaczenie kliniczne badań: „z punktu widzenia praktycznego, najważniejszym odkryciem obecnej pracy jest zaobserwowanie efektu wzmacniania przez 1,25-$(OH)_2D_3$ działania GKS wobec subpopulacji monocytów CD14++CD16+ i CD14+CD16++ oraz wykazanie, że w obecności witaminy D3 nawet 5-krotne zredukowanie dawki GKS pozwoliło na utrzymanie porównywalnych efektów przeciwzapalnych". W opinii piszącego te słowa to ważne element pracy, która nie tylko odnosi się do obecnej wiedzy, ale też otwiera kolejne pola do badań i ma istotny wpływ na praktykę kliniczną. Doktorant zachował krytycyzm zarówno w odniesieniu wyników uzyskanych przez innych badaczy jak i do własnych rezultatów. Większość prac, które analizuje autor pochodzi z światowego piśmiennictwa ostatnich lat. Dobór piśmiennictwa świadczy o szerokiej wiedzy z zakresu immunologii i farmakologii prezentowany przez Doktoranta.

Na podstawie uzyskanych wyników i ich dyskusji autor wysunął następujące wnioski:

1. Kalcytriol (1,25-$(OH)_2D_3$), podobnie jak metylprednizolon, w warunkach *in vitro* wykazuje właściwości istotnego obniżania liczby monocytów z ekspresją CD16 (zarówno pośrednich, jak i nieklasycznych).

2. Zastosowanie kalcytriolu pozwala na znaczącą redukcję dawki GKS koniecznej do uzyskania istotnego obniżenia odsetka monocytów pośrednich i nieklasycznych.

3. Działanie kalcytriolu wobec monocytów nieklasycznych, ale nie monocytów pośrednich, jest najprawdopodobniej związane z aktywacją apoptotycznych szlaków zależnych od kaspaz.

4. Efekty działania kalcytriolu wobec monocytów nieklasycznych i, w mniejszym stopniu, monocytów pośrednich wydają się być związane ze szlakami zależnymi od receptora dla glikokortykosteroidów.

5. Przeciwzapalne działanie kalcytriolu wobec monocytów związane jest nie tylko z obniżeniem liczby prozapalnych subpopulacji monocytów, ale i obniżeniem sekrecji prozapalnej cytokiny TNF-alfa.

6. Uzyskane w obecnej pracy wyniki sugerują, że dołączenie witaminy D3 do terapii GKS miałoby szansę zwiększyć ich właściwości obniżania potencjału prozapalnego zależnego do monocytów lub nawet obniżenia dawki GKS koniecznej do uzyskania takiego efektu.

Wnioski te odpowiadają celom pracy opisanym w jej wstępie.

Z obowiązku recenzenta odnotuję nieliczne drobne błędy autora, które nie umniejszają wartości pracy. Proponowałbym umieszczenie wykazu skrótów stosowanych w pracy, spis rycin, w pracy znalazło się klika błędów literowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa i wyniki przedstawionych badań stanowią wartościowe i interesujące opracowane. Rozprawa została dobrze opracowana i starannie wykonana. Wyniki uzyskane przez doktoranta dowodzą istnienia nowych nieznanych dotąd właściwości immunomodulujących witaminy D3 wobec monocytów. Znaczenie kliniczne związane jest z możliwością zastosowania witaminy D3 dla wspomagania i redukcji dawek stosowanych glikokortykosteroidów. Prezentowane wyniki wskazują na nowe kierunki badań.

Uważam, że praca mgr Kamila Grubczaka „Badania doświadczalne nad zastosowaniem witaminy D3 jako czynnika modulującego fenotyp i funkcję monocytów z ekspresją CD16" w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Kamila Grubczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Wniosek ten uzasadnia 1) nowatorski charakter prowadzonych badań, 2) ich oryginalność i znaczenie dla rozwoju nauki i praktyki klinicznej, 3) publikację części wyników w *International Archives of Allergy and Immunology*, jednym z czołowych czasopism alergologicznych.

dr hab. med. Marek Niedoszytko prof. nadzw.
specjalista alergologii,
chorób płuc, chorób wewnętrznych
1563406

dr hab. med. Marek Niedoszytko prof. nadzw.

Gdańsk 06-08-2016