Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Znak: LDZ LKL

Katowice, 23.05.2021r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. Pawła Bieleckiego

pt.: „Ocena wpływu ekspozycji na dym tytoniowy na ekspresję czynników regulujących angiogenezę u myszy z wyciszonym genem 12/15-*Alox*".

Katedra i Klinika
Laryngologii
Wydział Nauk
Medycznych
w Katowicach

40-027 KATOWICE
ul. Francuska 20-24
laryngologia@spskm.katowice.pl

KIEROWNIK
prof. dr hab. n. med. J. Markowski
tel.: (+48 32) 25 91 460

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32)25 91 460

laryngologia@spskm.katowice.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Badania interdyscyplinarne łączące w sobie wiedzę i doświadczenie różnych dziedzin medycyny dają możliwość wykorzystania dorobku różnych specjalności i tym samym poznania istoty przebiegu schorzeń z wielu punktów widzenia. Badania takie stwarzają szansę nowego podejścia do zapobiegania i leczenia tych chorób z wykorzystaniem wiedzy z różnych dziedzin.

Rozprawa doktorska lek. Pawła Bieleckiego jest właśnie takim przykładem badań naukowych z wykorzystania wiedzy z różnych dziedzin, w tym przypadku z zakresu biologii molekularnej, biochemii, alergologii, pulmonologii i onkologii w diagnozowaniu ryzyka rozwoju przewlekłych chorób zapalnych i nowotworowych układu oddechowego.

Przewlekłe choroby zapalne i nowotworowe układu oddechowego są schorzeniami o podłożu genetycznym, wynikającą w większości przypadków z nabytych mutacji oraz ze zmian genetycznych, które wpływają na ekspresję genów. W ich rozwoju istotną rolę odgrywa również wpływ czynników środowiskowych, wśród których na pierwszym planie jest palenie tytoniu. Zgodnie z tą tezą, największą obecnie rolę w badaniach nad biologią molekularną i biochemią przewlekłych stanów zapalnych i schorzeń nowotworowych układu oddechowego odgrywa identyfikacja markerów genetycznych, jakich można użyć do precyzyjnego ustalenia możliwości prognozowania powstania tych schorzeń na podstawie ustalonego profilu genów. Z tego powodu temat pracy doktorskiej podjęty przez Doktoranta należy uznać za niezwykle ważny.

Regulacja angiogenezy i jej rola w procesie powstawania przewlekłych chorób zapalnych i nowotworowych układu oddechowego to wciąż wyzwanie dla laryngologów, alergologów, pulmonologów i onkologów a wiele aspektów tego procesu, jak np. liczne czynniki regulujące pozostają nie do końca wyjaśnione. Biorąc pod uwagę z jednej strony ogromne postępy biologii molekularnej stwarzającej nadzieję na ustalenie istotnych klinicznie markerów regulujących proces angiogenezy a z drugiej wciąż nie do końca poznaną etiologię przewlekłych chorób układu oddechowego temat pracy doktorskiej podjęty przez Doktoranta jest istotny zarówno z klinicznego jak i molekularnego punktu widzenia.

Badania nad patofizjologią schorzeń układu oddechowego stanowi nadal jeden z głównych kierunków badań w biologii molekularnej, biochemii i pulmonologii. Rozprawa doktorska lek. Pawła Bieleckiego wpisuje się w ten nurt badań we wciąż mało dotychczas poznanym aspekcie a mianowicie regulacji procesu angiogenezy.

Tak więc temat pracy doktorskiej jest bardzo dobrze dobrany, gdyż jest aktualny i nowatorski oraz niesie aspekt nowości i innowacyjności, tak ważny w pracach młodych naukowców. Stanowi bardzo nowoczesne podejście do problematyki schorzeń układu oddechowego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. med. Marka Rogowskiego – Kierownika Katedry i Kliniki Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Rozprawa doktorska lek. Pawła Bieleckiego liczy 98 stron maszynopisu i jest zredagowana w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Składa się z 13 rozdziałów ułożonych logicznie z zachowaniem odpowiednich proporcji oraz posiada czytelną oprawę graficzną (zawiera 8 tabel, 8 rycin i 11 zdjęć), ułatwiającą zapoznanie się z zawartością pracy i uzyskanymi wynikami.

Należy podkreślić bardzo dobrze opracowany 21 – stronicowy wstęp podzielony na 7 podrozdziałów omawiających zjawisko angiogenezy, czynniki regulujące ten proces, strukturę i funkcję 15-lipoksygenazy, charakterystykę genu 15-lipoksygenazy i strukturę jego białka oraz rolę 15-lipooksygenazy w regulacji procesów związanych z angiogenezą. Wstęp ten stanowi swoisty *„state of art”* obecnego stanu wiedzy na temat procesu angiogenezy i czynników ją regulujących.

W dalszej części dysertacji – w rozdziale 2 – Doktorant sformułował założenia i cele pracy. Celem głównym była ocena roli *12/15-LOX* w regulacji ekspresji genów kodujących białka biorące udział w procesie przebudowy tkanek i angiogenezy w płucach myszy poddanych ekspozycji na dym tytoniowy. Natomiast celami szczegółowymi pracy była ocena wpływu wyciszenia genu *12/15-Alox* na zmiany strukturalne w układzie oddechowym, na nasilenie procesu zapalnego w płucach, na zmiany ekspresji wybranych genów kodujących białka biorące udział w procesie przebudowy tkanek i angiogenezy oraz ocena związku pomiędzy zmianami strukturalnymi i nasileniem procesu zapalnego w tkance płucnej a zmianami ekspresji wybranych genów kodujących białka biorące udział w procesie przebudowy tkanek i angiogenezy na skutek ekspozycji na dym tytoniowy u myszy z wyciszonym genem *12/15-Alox* w porównaniu z myszami niepoddanymi modyfikacji genetycznej.

Kolejny rozdział dysertacji to materiał i metody zastosowane przez Autora w swoich badaniach. Doktorant swoje badania przeprowadził na modelu zwierzęcym składającym się łącznie ze 120 myszy, z tego 60 myszy z wyciszonym genem 12/15-Alox będącym mysim ortologiem ludzkiego genu *15ALOX* kodującego 15-LOX oraz 60 genetycznie nie zmodyfikowanych myszy stanowiących grupę kontrolną. Badania zostały przeprowadzone w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Zakładzie Biologii Molekularnej UMB oraz w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej UMB. Myszy z obu badanych grup zostały poddane ekspozycji na dym tytoniowy za pomocą urządzenia symulującego palenie czynne.

Na wykonanie badań Doktorant uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgody 46/2015).

Dobór metod badawczych nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym ich opanowaniu praktycznym przez Doktoranta. Na uwagę zasługuje także bardzo staranny dobór metod statystycznych do analizy wyników badań. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem programu Statistica przy użyciu testów nieparametrycznych. Porównania wielu grup zostały wykonane przy pomocy testu ANOVA a porównywania dwóch grup przy użyciu testu U Manna – Whitneya. Za poziom

istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$. Kolejność prezentacji wyników jest jasna i logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy.

Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Doktoranta w ocenie patomorfologicznej zmian tkanki płucnej myszy w zakresie zarówno nasilenia zmian o typie rozedmy jak i wielkości nacieku tkanki płucnej przez makrofagi.

Unikalną wartością pracy są zastosowane przez Doktoranta nowoczesne techniki badań molekularnych w ocenie zmian ekspresji genów związanych z procesem angiogenezy na poziomie RNA przy użyciu macierzy PCR. Te nowoczesne metody badawcze pozwoliły Doktorantowi na zrealizowanie programu badawczego zmierzającego do określenia genów o podwyższonej ekspresji po ekspozycji na dym tytoniowy w grupie myszy dzikich i grupie myszy pozbawionych genu *12/15-Alox (12/15-ALoxKO).* Tak kompleksowe podejście Autora do metodyki badań molekularnych stanowi o dużej wartości merytorycznej tej rozprawy.

Wyniki badań zostały przedstawione i omówione w odrębnym rozdziale w formie opisowej oraz przejrzystych tabel i rycin, przy których opracowaniu zastosowano właściwe metody analizy statystycznej. Wyniki badań i ich omówienie obejmują łącznie 7 podrozdziałów, w których oceniono uzyskane wyniki w zakresie wszystkich celów rozprawy. W rozdziale tym Autor dysertacji dokonuje analizy histopatologicznej tkanki płucnej myszy dzikich oraz myszy pozbawionych genu 12/15-lipooksygenzy, analizę histopatologiczną myszy dzikich i myszy pozbawionych genu 12/15 lipooksygenazy po 4-tygodniowej i 4-miesięcznej ekspozycji na dym tytoniowy oraz oceny zmian w ekspresji genów związanych z procesem angiogenezy na poziomie RNA przy użyciu macierzy PCR i pod wpływem ekspozycji na dym tytoniowy.

Sformułowane przez Doktoranta wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy. Doktorant wykazał, że ekspozycja na dym tytoniowy prowadzi do uszkodzenia płuc proporcjonalnego do czasu ekspozycji zarówno w grupie myszy niemodyfikowanych genetycznie (grupa kontrolna) jak i myszy genetycznie genetycznie zmodyfikowanych (z wyciszonym genem *12/15-Alox*). Uszkodzenie to wyrażało się rozwojem zmian o charakterze rozedmy. Wykazał, że uszkodzenie układu oddechowego spowodowane ekspozycja na dym tytoniowy było większe w grupie myszy z wyciszonym genem *12/15-Alox* w porównaniu z myszami niemodyfikowanymi genetycznie, czego wyrazem był szybszy rozwój i większe

natężenie zmian o charakterze rozedmy. Stwierdził, że wyciszenie genu *12/15-Alox* wiązało się z silniejsza odpowiedzią zapalną pod wpływem ekspozycji na dym tytoniowy wyrażoną większą liczbą makrofagów w tkance płucnej jak również wyciszenie tego genu prowadziło do ilościowych i jakościowych zmian w profilu ekspresji genów kodujących białka biorące udział w regulacji przebudowy tkanek w porównaniu z myszami niepoddanymi modyfikacji genetycznej, jak również wyciszenie genu wiązało się ze znacznie słabszą indukcją ekspresji genów kodujących czynniki wzrostowe, co może mieć wpływ na zbyt słabą odpowiedź regeneracyjną układu oddechowego, co z kolei prowadzi do nasilenia zmian rozedmowych. Stwierdził również istotny wzrost ekspresji genów kodujących chemokiny, co należy wiązać z większym naciekiem zapalnym z makrofagów stwierdzonych w tej grupie zwierząt pod wpływem ekspozycji na dym tytoniowy. Wykazał, ze 12/15-lipoksygenaza pełni ochronną rolę przed rozwojem uszkodzenia dróg oddechowych spowodowanych przewlekłą ekspozycja na dym tytoniowy na drodze regulacji procesów regeneracyjnych oraz hamowaniu odczynu zapalnego. Tak więc modyfikacja aktywności 12/15-lipoksygenazy może być celem interwencji terapeutycznych mających na celu zapobieganie lub łagodzenie skutków przewlekłych chorób układu oddechowego spowodowanych ekspozycja na dym tytoniowy.

Wszystkie wnioski sformułowane przez Doktoranta są oryginalnymi wnioskami autora, dotychczas nie znanymi i nie opisywanymi w piśmiennictwie. Jest to oryginalny dorobek Doktoranta na polu wpływu dymu tytoniowego na proces angiogenezy.

Rozprawa zawiera 176 pozycji piśmiennictwa obejmujące wszystkie aktualne pozycje literaturowe w zakresie angiogenezy, 15-lipooksygenazy oraz wpływu dymu tytoniowego na układ oddechowy.

Przeprowadzona przez Doktoranta w dysertacji dyskusja wykazała, iż Doktorant posiada umiejętność krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z danymi z piśmiennictwa. Kolejność prezentacji wyników jest jasna i logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorant przeprowadził badania nie mających dotąd odzwierciedlenia w literaturze. Występują tylko pojedyncze doniesienia wskazujące na powiązania 15-LOX z chorobami płuc indukowanymi ekspozycją na dym tytoniowy. Natomiast w ogóle nie badano dotychczas roli 15-LOX na regulację procesów przebudowy tkanek w płucach podanych ekspozycji na dym tytoniowy. Należy podkreślić

trafność wyboru tematu. Rozprawa stanowi logiczną całość, świadczy o dobrym przygotowaniu Autora do prowadzenia badań naukowych oraz ich prezentacji.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona mi do oceny praca doktorska lek. Pawła Bieleckiego pt.: „Ocena wpływu ekspozycji na dym tytoniowy na ekspresję czynników regulujących angiogenezę u myszy z wyciszonym genem *12/15-Alox*" ma w polskim piśmiennictwie charakter pionierski i jest punktem wyjścia do dalszych badań nad wpływem dymu tytoniowego na układ oddechowy i regulacji procesu angiogenezy. Nie wnoszę żadnych uwag merytorycznych ani redakcyjnych.

W analizowanej dysertacji Doktorant wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii, formułowania celów zaplanowanych badań naukowych i wyciągania wniosków z nich wypływających. Rozprawa przyczynia się do lepszego poznania patofizjologii układu oddechowego, stąd też jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tym zakresie. Po raz pierwszy w polskim piśmiennictwie oceniono tak szczegółowo zarówno wpływ dymu tytoniowego na układ oddechowy w aspekcie angiogenezy. Stanowi istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Doktoranta do problematyki badań nad agiogenezą i schorzeniami układu oddechowego.

Bardzo wysoko oceniam wartość naukową rozprawy doktorskiej lek. Pawła Bieleckiego i w związku z tym mam zaszczyt wystąpić do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec bardzo wysokich walorów merytorycznych rozprawy doktorskiej oraz biorąc pod uwagę pionierską w skali kraju koncepcję dysertacji lek. Pawła Bieleckiego, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Laryngologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
J. Markowski
prof. dr hab. n. med. Jarosław Markowski