



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Wydział Lekarski

Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego

Warszawa, 7 lipca 2022

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

magister Urszuli Radzikowskiej

Tytuł rozprawy: „Effects of house dust mite stimulation on inflammasome activation in human bronchial epithelium in asthma after rhinovirus infection.” (Efekty stymulacji ekstraktem roztoczy kurzu domowego na aktywację inflamasomu w zakażonych rinowirusem komórkach nabłonka oskrzeli)

Astma jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych układu oddechowego. Chorobowość na astmę szacowana jest na ok. 5-10% populacji ogólnej. Wśród czynników prowadzących do nabycia astmy wymienia się: skłonność genetyczną zaburzającą miejscową regulację odpowiedzi immunologicznej w nabłonku dróg oddechowych oraz szereg czynników środowiskowych, takich jak ekspozycję na smog, dym tytoniowy, oraz inne liczne czynniki ekspozycji (środowisko wiejskie i miejskie), a także wirusy oddechowe.

Do zaostrzeń astmy przyczyniają się: (i) infekcje wirusowe dróg oddechowych, w szczególności rinowirusowe (RV) oraz (ii) ekspozycja na alergen, przy czym wzajemna relacja tych czynników i wiążące je mechanizmy subkomórkowe pozostają obiektem intensywnych badań. Dopiero badania ostatnich lat rzuciły nowe światło na synergistyczny efekt jaki obserwuje się między zakażeniami wirusowymi dróg oddechowych, a ekspozycją na alergen w indukowaniu zaostrzenia astmy alergicznej. Istota tego zjawiska została poznana początkowo na poziomie cytokinowym, natomiast dopiero od niedawna zaczynamy rozumieć, jak przebiegają szlaki aktywacji zjawisk immunologicznych w tej chorobie w komórkach nabłonka dróg oddechowych.

Praca doktorska pani magister Urszuli Radzikowskiej stanowi istotny wkład w wiedzę na temat istoty zjawisk immunologicznych, które mają miejsce w komórkach nabłonka oddechowego wskutek ekspozycji na alergen kurzu domowego i po zakażeniu rinowirusem.

Praca doktorska Urszuli Radzikowskiej została wykonana we współpracy między Zakładem Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Szwajcarskim Instytutem Badań nad Alergią i Astmą w Davos, w Szwajcarii, gdzie praca doktorantki zaowocowała do tej współpracy w kilkunastu artykułach naukowych o łącznym IF ponad 100, i ponad 600 cytowaniami. Jest ona pierwszym autorem dwóch artykułów oryginalnych (jedna publikacja opublikowana i jedna opublikowana jako „preprint”) oraz dwóch artykułów przeglądowych, opublikowanych w czasopismach o bardzo wysokim wskaźniku Impact Factor.

W swojej pracy doktorantka dokonała analizy interakcji pomiędzy dwoma wirusami oddechowymi (RV i SARS-CoV-2) oraz alergenem kurzu domowego w komórkach nabłonka oskrzeli *in vitro* oraz w trakcie eksperymentalnego zakażenia wirusem osób zdrowych i pacjentów chorych na astmę. Doktorantka wykazała, że komórki nabłonka oskrzeli rozpoznają wirusa za pomocą receptora RIG-I, co z kolei prowadzi do aktywacji inflamasyonu RIG-I za pośrednictwem adaptorowego białka inflamasyonu ASC. Zaobserwowano, że zjawisko aktywacji inflamasyonu było znacząco bardziej nasilone u chorych na astmę, a efekt ten był znacząco zwielokrotniony wskutek wcześniejszej ekspozycji na alergen (np. alergen roztoczy). Ponadto działanie alergenu (w tej pracy ekstraktu roztoczy kurzu domowego) skutkowało nasileniem aktywacji inflamasyonu i wczesnego hamowania odpowiedzi przeciwwirusowej, zależnej od szlaku interferonu typu I i III, co prowadziło do przedłużającego się stanu zapalnego i upośledzonej odpowiedzi przeciwwirusowej. Doktorantka wykazała, że w nabłonku dróg oddechowych u pacjentów chorych na astmę istnieje brak równowagi pomiędzy wykorzystaniem RIG-I jako sensora i inicjatora aktywacji inflamasyonu, a wykorzystaniem go jako głównego aktywatora odpowiedzi przeciwwirusowej. Może to być przyczyną przedłużających się zaostrzeń choroby, szczególnie kiedy zakażenie wirusowe poprzedzone jest ekspozycją na alergen.

W mojej ocenie wyniki te mogą przyczynić się do opracowania potencjalnych terapii nakierowanych na hamowanie aktywacji inflamasyonu i szybszej eliminacji wirusa z nabłonka oddechowego.

W tym kontekście temat podjęty przez Doktorantkę jest aktualny i w przyszłości istotny klinicznie.

Warto podkreślić, że opisane w rozprawie eksperymenty i odkrycia zostały przyjęte do publikacji w jednym z najbardziej renomowanych czasopism przyrodniczych na świecie jakim jest Nature Communications (IF 17,7).

Formalna ocena rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa ma postać 123 stronicowego manuskryptu składającego się z typowych rozdziałów.

Zamieszczony na początku rozprawy przejrzysty spis treści oraz wykaz skrótów stanowią dla czytelnika znaczne ułatwienie i dowodzą, że układ rozprawy został odpowiednio przemyślany.

Praca została napisana w poprawnym języku angielskim, z dbałością o jednoznaczność wyrażanych treści. Niewątpliwą zaletą pracy jest aneks zawierający zestawienie rycin, które przedstawiają kolejne dane eksperymentalne.

Wstęp ma charakter szerokiego wprowadzenia w zagadnienia astmy i jej zaostrzeń a także immunologii nabłonka dolnych dróg oddechowych oraz specyfiki odpowiedzi immunologicznej w tym obszarze. Szczegółowo została przedstawiona rola nieswoistej odpowiedzi immunologicznej nabłonka na zakażenie rinowirusowe. Szczegółowy opis aktywacji inflamasomu świadczy o odpowiedniej znajomości tematu przez Doktorantkę. Dane dotyczące potencjalnej roli aktywacji inflamasomu w nabłonku osób chorych na astmę uzasadniają podjęcie badań z uwzględnieniem korzyści, które mogą z nich wynikać. Podoba mi się dobór piśmiennictwa do tego fragmentu pracy.

Cel pracy został przedstawiony w postaci pięciu problemów badawczych, których wyjaśnienia podjęła się Autorka rozprawy. Zostały one postawione w sposób jasny i zrozumiały.

Rozdział **Material i Metody** zawiera charakterystykę badanej grupy pacjentów. Szczegółowo opisana jest metoda wykonywania badań *in vivo* hodowli komórek nabłonka a także techniki przeprowadzania infekcji komórek nabłonka, ich stymulacji alergenem roztoczy oraz zaawansowane metody biologii molekularnej takie jak: analiza transkryptomu, RT-PCR, analiza białek metodą Western-Blot, mikroskopia konfokalna oraz pomniejsze techniki immunologiczne.

W rozdziale tym zabrakło jednak kilku istotnych informacji z punktu widzenia metodologii prowadzenia badań. Nie ma informacji, czy pozyskiwanie materiału do badań było wykonywane przez jedną osobę, czy przez różnych badaczy? Z lektury pracy wynika, że eksperymentalne zakażenie rinowirusem A16 u osób chorych na astmę oraz bronchoskopowe pobranie materiału było w kilku ośrodkach: w szpitalu St Mary's w Londynie (David Jackson), w

Szpitalu Uniwersyteckim Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz prywatnym ośrodku ALL-MED we Wrocławiu, i najpewniej badania wykonywane były przez różne osoby i mogło to mieć wpływ na jakość uzyskanego materiału badawczego, różny wpływ czynników środowiskowych, modyfikujących epigenetycznie funkcje immunologiczne nabłonka, a w konsekwencji - uzyskane wyniki. Nie do końca wiadomo także jaki było proces rekrutacji pacjentów. Jak długo trwała astma? Jakie były szczegółowe kliniczne dane? Czy była to astma atopowa czy neutrofilowa? Czy ciężka czy epizodyczna? Czy dobór grupy badanej odbywał się w inny sposób? Ciekawą byłaby analiza nabłonka pobranego od pacjentów pediatrycznych, gdyż wówczas uzyskane wyniki byłoby przynajmniej częściowo pozbawione szumu informacyjnego wynikającego z nakładających się zmian epigenetycznych. Odpowiedzi na te pytania przynajmniej częściowo mogłyby znaleźć się w dyskusji.

W pracy zastosowano odpowiednie metody statystyczne.

Wyniki zostały przedstawione na 34 stronach pracy, w 6 tabelach oraz 24 rycinach. Sposób prezentacji wyników jest przejrzysty i spektakularnie kolorowy. Przedstawione w pracy ryciny obrazują analizowane różnice między grupami badanymi i kontrolnymi oraz ekspresję genów i obrazy mikroskopowe w trakcie eksperymentalnych infekcji rinowirusem oraz po stymulacji alergenem.

Dyskusja napisana jest w sposób przejrzysty i zrozumiały. Autorka omawia w niej przede wszystkim wyniki pracy własnej oraz podejmując próbę odniesienia ich do wyników uzyskanych przez innych badaczy. Dyskusja zajmuje 6 stron.

Wyniki przeprowadzonych badań znalazły swoje podsumowanie w sześciu **wnioskach**. Zawierają one odpowiedzi na cele, które postawiła przed sobą Doktorantka. Wyciągnięte wnioski poparte są wynikami badań przedstawionymi w pracy.

Wykaz piśmiennictwa zawiera 182 pozycje, z których przeważająca większość została opublikowana w ciągu ostatnich dwóch lat. Dobór piśmiennictwa jest odpowiedni i świadczy o szerokiej znajomości tematu.

Wniosek końcowy

Podsumowując, uważam, że przedłożona mi do recenzji praca spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2002 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresie sztuki (art.14 ust. 2 pkt. 2) oraz paragraf 6 ust.1 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w

przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Jej niewątpliwa wartość wynika z podjęcia istotnego tematu, oryginalnego charakteru badania oraz interesujących wyników mogących w przyszłości przyczynić się do zmiany praktyki klinicznej. Praca wnosi więc istotny wkład do badań nad zrozumieniem mechanizmów opóźnionej eliminacji wirusów z nabłonka chorych na astmę i roli ekspozycji na alergen w tym zjawisku.

Dlatego mam przyjemność **wystąpić do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie mgr. Urszuli Radzikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wybitny dorobek naukowy doktorantki oraz bardzo wysoki wskaźnik Impact Factor towarzyszący jej publikacjom mam przyjemność wnioskować do **Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie dla tej pracy doktorskiej.**

dr hab. n. med. Wojciech Feleszko



dr. hab. n. med. Wojciech Feleszko
specjalista chorób płuc dzieci,
IMMUNOLOG, PEDIATRA
Nr 4762962

Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieków Dziecięcego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego