

## **RECENZJA PRACY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH**

**magister Ewy Pniewskiej**

**pt. „Wpływ fosfolipaz z grupy A<sub>2</sub> na rozwój zapalenia w patogenezie przewlekłych chorób obturacyjnych: ciężkiej postaci astmy oskrzelowej i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc” wykonanej pod kierunkiem prof. zw. dr hab. med. Rafała Pawliczaka w Katedrze Alergologii, Immunologii i Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.**

Przewlekły proces zapalnych ogólnoustrojowy oraz miejscowy w układzie oddechowym charakteryzuje zarówno astmę oskrzelową, jak i przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP). Obok podobieństw, zwłaszcza w obrazie klinicznym, aktualny stan wiedzy wskazuje na szereg zasadniczych różnic w patomechanizmie procesu zapalnego rozwijającego się w przebiegu tych chorób. Fosfolipazy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), jako enzymy uczestniczące w szlaku produkcji lipidowych mediatorów- eikozanoidów, odgrywają istotną rolę w rozwoju, modulacji i wygaszaniu zapalenia, również toczącego się w przewlekłe w obrębie płuc. Jednak szczegółowa wiedza, zwłaszcza w zakresie zróżnicowanej roli PLA<sub>2</sub> w patogenezie obu chorób układu oddechowego wydaje się niepełna. Słusznym wydaje się więc podejmowanie badań w tym zakresie tematycznym.

Celem pracy doktorskiej magister Ewy Pniewskiej było zweryfikowanie udziału i wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi grupami fosfolipaz A<sub>2</sub> u chorych na ciężką postać astmy oskrzelowej oraz przewlekłą obturacyjną chorobę płuc w porównaniu do osób zdrowych, jak również wskazanie różnic w rozwoju i obrazie zapalenia, w zależności od mechanizmów inicjujących/zaostarzających stan zapalny. Jako kryterium różnicujące obraz molekularny obu jednostek chorobowych wybrano pięć grup genów (fosfolipazy A<sub>2</sub>, ścieżka eikozanoidów, cytokiny, czynniki transkrypcyjne, remodeling) oraz udział czynników etiologicznych: alergenów (Der p1 i Fel d1) i lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów: jednego pogładowego i dwóch oryginalnych, których Doktorantka jest pierwszym autorem. Jej wiodąca rola w zakresie koncepcji, wykonawstwa, analizy i interpretacji wyników została potwierdzona oświadczeniami współautorów. Każda z załączonych prac została opublikowana w czasopiśmie z Impact Factor powyżej 2, odpowiednio 2,417; 2,433; 2,706. W mojej opinii publikacje spełniają wymogi stawiane artykułom będącym podstawą rozprawy doktorskiej.

Rozprawa zawiera wstęp, w którym Doktorantka syntetycznie i rzetelnie uzasadnia słuszność podjętych badań, w sposób przekonujący wykazując się dobrą znajomością tematyki prowadzonych badań.

Każdy z kolejnych rozdziałów zawiera krótkie wprowadzenie i jedną publikację. W ten sposób autorka bardzo dobrze prezentuje i uwypukla spójność tematyczną przedstawionych prac.

Pierwsza publikacja o charakterze poglądowym stanowi kompleksowe zestawienie aktualnych informacji na temat roli fosfolipaz A<sub>2</sub> w rozwoju astmy i POChP. Wzbogacona o informacje ogólne dotyczące charakterystyki fosfolipaz z nadrodziny A<sub>2</sub>, mechanizmów ich działania i udziale w procesach fizjologicznych i patologicznych stanowi cenną pozycję literaturową. Autorka omawia podjęte dotychczas problemy badawcze, oraz wskazuje na luki w istniejących danych, co ułatwia stawianie nowych hipotez i celów naukowych. Prezentuje w ten sposób również przesłanki do podjętych prac doświadczalnych. W publikacji cytowanych jest 110 pozycji piśmiennictwa

Druga publikacja- oryginalna dotyczy udziału fosfolipaz A<sub>2</sub> oraz innych białek w odpowiedzi komórek jednojądrowych krwi pacjentów chorych na ciężką postać astmy oskrzelowej i POChP na alergen i/lub lipopolisacharyd bakteryjny. Prace badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane, zwraca uwagę szczegółowa charakterystyka kliniczna uczestników badania. Atutem badania było zastosowanie nowoczesnej metodyki molekularnej (*real-time* PCR z wykorzystaniem kart *TaqMan Low Densit Array*, immunoblottingu,), a także wykorzystanie do stymulacji komórek rekombinowanych antygenów, w miejsce często stosowanych ekstraktów. Uważam, że wykorzystanie do badań komórek jednojądrzastych było słuszną decyzją, przybliżającą autorów do odtworzenia faktycznych warunków panujących *in vivo* we krwi obwodowej – mnogich interakcji wielu populacji i subpopulacji komórkowych. Dzięki odpowiedniej konstrukcji i dobrze dobranym nowoczesnym narzędziom badawczym autorka mogła wyciągnąć oryginalne i wartościowe wnioski wskazując na interesujące różnice w ekspresji genów, zwłaszcza prozapalnych, w poddanych stymulacji komórkach pozyskanych od chorych na astmę lub POChP. Pewien niedosyt pozostawił u mnie fakt, że autorka nie zgłębiła w dyskusji bardzo frapującej różnicy pomiędzy ekspresją genu ANXA1 i jego białka w komórkach chorych na POChP.

Trzecia publikacja stanowi uzupełnienie wcześniejszych badań. Doktorantka szczegółowo zaplanowała schemat badania analizując wpływ różnych czynników (alergenów i LPS), ich dawki, czasu stymulacji na ekspresję i aktywność wybranych fosfolipaz PBMC

pozyskanych od chorych na ciężką postać astmy oskrzelowej o podłożu atopowym. Grupa chorych oraz zdrowych kontroli została dobrze scharakteryzowana klinicznie, metodyka badań prawidłowo zaplanowana. Badania rozszerzono o eksperymenty z wykorzystaniem komórek A549 jako modelu pneumocytów typu II. Warto pamiętać, że jest to jednak *de facto* linia gruczołowego raka płuca wywodząca się nabłonka wyściełającego pęcherzyki płucne. Stąd wybór linii A549 rodzi w mojej opinii pewne kontrowersje, zwłaszcza w kontekście obserwowanych i niewyjaśnionych w pracy zmian morfologicznych w hodowlach tych komórek poddanych działaniu wyższych stężeń rDer p1. Uzyskane wyniki potwierdzają udział enzymów PIA2 w alergicznej odpowiedzi zapalnej rozwijającej się pod wpływem kontaktu z rekombinowanymi antygenami roztoczy (rDer p1) oraz kota (Fel d1). Autorka wskazała na szczególnie istotną rolę izoformy sPLA<sub>2</sub>X w rozwoju odpowiedzi zapalnej na działanie Fel d1.

W obu pracach oryginalnych zastosowano nadzwyczaj krótki okres „wash out” dla kortykosteroidów doustnych, jedynie 24 godziny. Nie jest on na tyle długi, aby zniwelować efekty działania tych preparatów, należy więc liczyć się z możliwością wpływu kortykosteroidów na zaobserwowane odpowiedzi komórek. Autorka nie odniosła się do tego problemu w dyskusjach prac.

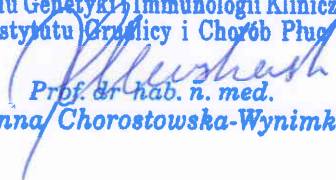
Podsumowanie pracy jest rozszerzeniem dyskusji i wniosków przedstawionych w artykułach, jak również stanowi omówienie wszystkich wyników, ograniczeń prezentowanych badań. Doktorantka analizuje również wpływ publikacji na rozwój dyscypliny. W podsumowaniu autorka formułuje trzy wnioski odpowiadające przedstawionym wynikom szczegółowym.

Reasumując, praca doktorska Pani mgr Ewy Pniewskiej podejmuje istotny problem naukowy. Doktorantka precyzyjnie sformułowała cele badawcze, jak również trafnie dobrała metody badawcze. Wyniki przedstawiła w klarowny sposób. Na uwagę zasługuje dojrzała, krytyczna dyskusja, zarówno w publikacjach, jak i w końcowej części rozprawy. Zdecydowana część tekstu została przygotowana w języku angielskim. Jednak chciałabym również wyrazić uznanie dla ładnej i starannej polszczyzny, którą posługuje się Autorka w opisowej części pracy. Jej lektura była prawdziwą przyjemnością. Strona edytorska pracy nie budzi zastrzeżeń.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie kandydatki do dalszych

etapów przewodu doktorskiego. Zwracam się również z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy w uznaniu wysokiego poziomu zrealizowanych badań i przygotowanych publikacji, a także wagi podjętego tematu.

Warszawa 21. Kwietnia 2015r.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Genetyki i Immunologii Klinicznej  
Instytutu Geriatrii i Chorób Płuc  
  
Prof. dr hab. n. med.  
**Joanna Chorostowska-Wynimko**