



Dr hab.n.med. Jerzy Wójtowicz

Poznań, 28.12.2021r.

Klinika Otorinolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Katarzyny Kowalik
pt. „Funkcja kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF oraz inne aspekty
molekularne w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych”**

napisanej pod kierunkiem naukowym dr hab. n.med. Marioli Popko-Zagor
Klinika Otorinolaryngologii, Wydział Lekarsko-Stomatologiczny, WUM

1. Ocena wyboru tematu.

Autorka w rozprawie doktorskiej podjęła ważny i rozpowszechniony na świecie problem przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Należy podkreślić, że coraz większą rolę przywiązuje się do patomechanizmów tej choroby jej endotypów i na tej podstawie dobieranie odpowiedniej terapii. Związku z tym uważam, że wybór powyższego tematu na rozprawę doktorską uważam za trafny, a samo zagadnienie bardzo aktualne i interesujące z punktu widzenia klinicystów.

2. Ocena poprawności struktury rozprawy doktorskiej.

Otrzymana przeze mnie rozprawa doktorska zawarta jest na 139 stronach, przedstawiono: wykaz publikacji, słowa kluczowe, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, załączniki (kopie opublikowanych prac, zgody Komisji Bioetycznej WUM,

oświadczenia wszystkich współautorów publikacji). Według mojej oceny dokumenty te **spełniają wymogi formalne** określone w Ustawie z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zmianami Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, Dz.U. z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz.1228 oraz Dz. U. z 2011 r. Nr 84 poz. 455).

3. Ocena zawartości merytorycznej.

Doktorantka przedstawiła wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:

1. Katarzyna Kowalik, Elżbieta Sarnowska, Mariola Popko-Zagor: Aspekty molekularne patofizjologii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. *Otorynolaryngologia – przegląd kliniczny*, 2019; 75-88.
2. Katarzyna Kowalik, Martyna Waniewska-Łęczycka, Elżbieta Sarnowska, Natalia Rusetska, Janusz Sierdziński, Mariola Popko-Zagor: Role of Chromatin Remodeling Complex SWI/SNF and VDR In Chronic Rhinosinusitis. *Advances In Clinical and Experimental Medicine*, 2020; 29(3); 313-323
3. Katarzyna Kowalik, Martyna Waniewska-Łęczycka, Elżbieta Sarnowska, Natalia Rusetska, Alicja Chrzan, Marcin Ligaj, Mariola Popko-Zagor: The SWI/SNF complex In eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Acta Otorrhinolaryngologica Italica*, 2021; 41(2); 159-167

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej przedstawiła klasyfikację przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (PZZP) o oparciu o najnowsze zalecenia Europejskiego Towarzystwa Rynologicznego z roku 2020. Pozwoliło to na ocenę wnioskowań zawartych w pracy w odniesieniu do aktualnego konsensusu dotyczącego zapalenia zatok przynosowych. W podrozdziale dotyczącym patofizjologii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych Doktorantka w sposób bardzo przejrzysty przedstawia przyczyny oraz czynniki działające z uwzględnieniem kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF. W obszerny sposób autorka scharakteryzowała aspekty dziedziczenia w przypadku PZZP, wskazując również na procesy modyfikacji ekspresji genów.

Doktorantka przedstawiła zasady leczenia PZZP w oparciu o algorytmy wprowadzone przez EPOS 2012. W przypadku leczenia operacyjnego Doktorantka stosuje nazewnictwo endoskopowej operacji zatok przynosowych (ang. endoscopic sinus surgery – ESS), do rozważenia jest wprowadzenie w nazewnictwie określenie funkcjonalnej endoskopowej chirurgii zatok przynosowych (ang. functional endoscopic sinus surgery- FESS) jako częściej

stosowanego w piśmiennictwie. Zwłaszcza, że w treści pracy autorka podkreśla istotnej znaczenie procedury chirurgicznej jakim jest udrożnienie ujść zatok przynosowych.

W kolejnych rozdziałach pracy Doktorantka przedstawiła charakterystykę kompleksu SWI/SNF i jego rolę w mechanizmach zapalnych. Podkreślono znacznie wspomnianego kompleksu na metabolizm witaminy D. Jednocześnie zaznaczono w dyskusji, że witamina D ma działanie immunomodulujące na ekspresję genów przeciwzapalnych przez co zmniejszany jest miejscowy stan zapalny, dochodzi do stymulacji neutrofilii oraz makrofagów w odpowiedzi przeciwzapalnej. W pracy podkreślono również istotny element jakim jest wpływ kompleksu SWI/SNF na receptory glikokortykosteroidów, co wskazuje na pozytywne działanie tychże steroidów donosowych oraz doustnych w leczeniu PZZP. Działanie to wspomnianych kompleksów potwierdza, że związki te mają istotne zastosowanie w ograniczaniu stanu zapalnego w przebiegu PZZP.

Założenia i cel pracy jest odpowiednio sformułowane, odpowiadające tematyce pracy zawartej w tytule. Cele szczegółowe w liczbie sześciu są odpowiednio do tematyki pracy określone.

Materiał wykorzystany w pracy jest prawidłowo wyselekcjonowany, prawidłowo określono kryteria wyłączenia i wyłączenia pacjentów do badań. Badania przeprowadzono na grupie 165 pacjentów, 63 kobiet (38%) oraz 102 mężczyzn (62%), wiek pacjentów wynosił w przedziale 18 – 83 lat (średnia 42 lata). Cała grupa badawcza została podzielona na trzy podgrupy: 1./ 59 pacjentów bez cech zapalenia w obrębie jam nosa i zatok przynosowych; 2./ 52 pacjentów z PZZP bez zmian polipowatych w nosie; 3./ 54 pacjentów z PZZP ze zmianami polipowatymi w nosie. Do grupy kontrolnej włączono pacjentów zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego z powodu skrzywienia przegrody nosa lub anomalii w budowie anatomicznej bocznej ściany nosa.

Materiał do badania immunohistochemicznego stanowił pełnej grubości fragment błony śluzowej z okolicy kompleksu ujściowo-przewodowego pobrany od pacjentów śródoperacyjnie.

W badaniach molekularnych wykorzystano linie komórkowe ludzkiego nabłonka (linia P-C-C-12620 HNEpC-c firmy Biomedica)

Doktorantka w swojej pracy zastosowała u pacjentów biorących udział w badaniu autorską ankietę oraz subiektywną ocenę nasilenia dolegliwości zatokowych z zastosowaniem formularza SNOT-22. W badaniach endoskopowych ocena fenotypu oraz stopnia

zaawansowania PZZP opartą wg skali Lund-Kennedy oraz ocena stopnia zaawansowania PZZP w badaniu tomografii komputerowej z zastosowaniem skali Lund-Mackay.

W przypadku wykonywania barwień immunohistochemicznych stosowano technikę opartą skrawkach ścinanych z bloczków parafinowych z zastosowaniem wyspecjalizowanych trzech przeciwciał monoklonalnych: SMARCC1/BAF-155, BRG, BRM. Następnie oceniano intensywność barwienia immunohistochemicznego w powiększeniu 400x.

Wykonano również ocenę nacieku eozynofilowego w błonie śluzowej kompleksu ujściowo-przewodowego oceniając typowe preparaty histopatologiczne w powiększeniu 400x.

Kolejnymi badaniami przeprowadzonymi przez Doktorantkę to hodowla linii komórkowych ludzkiego nabłonka nosowego (nr P-C-C-126620 HNEpC-c Biomedica Polska). Szereg badań przeprowadzonych przez doktorantkę na tejże linii komórkowej obejmowało stymulację: 1. poprzez lipopolisacharydy, 2. enterotoksynę paciorkowciową typu B, 3. witaminę D3, 4, kombinację lipopolisacharydów lub wspomnianej enterotoksyny z witaminą D3.

Doktorantka dokonała analizy ekspresji podjednostek kompleksu SWI/SNF w komórkach ludzkiego nabłonka nosowego.

Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy pakietu SAS ver. 9.4.

Doktorantka w części 9. WYNIKI przedstawiła w sposób szczegółowy wnioski statystyczne poddając analizie trzy grupy badawcze: pacjentów z PZZP ze zmianami polipowatymi w jamach nosa (PZZPzPN), pacjentów z PZZP bez zmian polipowatych w jamach nosa (PZZPbPN) oraz pacjentów z grupy kontrolne. Należy podkreślić, że wyniki zostały przez Doktorantkę w pracy bardzo przejrzysto przedstawione w formie zarówno rycin obrazów histochemicznych jak histogramów. Pozwala to na ocenę komentarzy przedstawionych dla poszczególnych analiz i znacznie ułatwia zapoznanie się z wynikami.

W przypadku ekspresji BRG1 Doktorantka wykazała w materiale obu grup z PZZP wzrost ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej, przy braku różnic statystycznie znamiennej pomiędzy obiema grupami PZZP.

W przypadku ekspresji BRM Doktorantka wykazała w materiale obu grup z PZZP spadek ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej, stwierdzono również spadek aktywności w grupie PZZPzPN w porównaniu do grupy PZZPbPN.

W przypadku ekspresji BAF 155 Doktorantka wykazała w materiale obu grup z PZZP istotny statystycznie spadek ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej, przy tendencji do spadku aktywności w grupie PZZPzPN w porównaniu do grupy PZZPbPN.

W podrozdziale 9.2. Doktorantka dokonała analizy ekspresji podjednostek SWI/SNF do wielu analizowanych w pracy danych klinicznych nie uzyskując w większości znamienności statystycznej. Jedynie w przypadku ekspresji BRG1 a ilości eozynofilii i neutrofilii we krwi

obwodowej w przebiegu PZZPzPN stwierdzono istotną statystycznie korelację ujemną. W przypadku ekspresji BAF 155 w korelacji z ekspresją receptora dla witaminy D3 w przebiegu PZZPzPN stwierdzono istotną statystycznie korelację dodatnią.

Badania wykonane na analizowanej linii komórkowej zostały przedstawione w podrozdziale 9.3.

Badania preparatów histologicznych pobranych w przebiegu PZZP potwierdziły nasilenie się nacieku eozynofilowego, stwierdzono istotnie statystycznie znamienne wzrost w grupie chorych z eozynofilowym PZZP w stosunku do nie-eozynofilowego PZZP. Jednocześnie badania potwierdził istotną statystycznie pozytywną korelację w pomiędzy wspomnianym naciekiem eozynofilowym, a poziomem eozynofili we krwi obwodowej w przebiegu eozynofilowego PZZP, przy braku tejże korelacji w przebiegu nie-eozynofilowego PZZP.

Badania preparatów immunohistologicznych pobranych w przebiegu PZZP potwierdziły istotnie statystycznie znamienne ujemną korelację występowania eozynofili w nacieku eozynofilowym, w stosunku do ekspresji BRM, BRG oraz BASF 155. W przypadku grupy chorych z nie-eozynofilowym PZZP nie wykazano statystycznie znamiennej korelacji.

W przypadku analizy zależności pomiędzy wielkości nacieku eozynofilowego, a subiektywną ocenę nasilenia dolegliwości zatokowych z zastosowaniem formularza SNOT-22, stopniem zaawansowania PZZP wg skali Lund-Kennedy oraz ocena stopnia zaawansowania PZZP w badaniu tomografii komputerowej wg skali Lund-Mackay uzyskano następujące wyniki:

1. Istotnie statystycznie dodatnią zależność z wartościami w skali Lund-Mackay w grupie chorych z eozynofilowym PZZP.
2. Nie stwierdzono istotnych korelacji w przypadku porównywania grupy chorych z eozynofilowym PZZP. A nie-eozynofilowym PZZP.
3. Dla grupy chorych z eozynofilowym PZZP stwierdzono istotne korelację ujemną pomiędzy wartościami skali Lund-Mackay z podjednostkami BRM oraz BAF 155.
4. W przypadku skali SNOT-22 potwierdzono statystycznie znamienne ujemne korelacje z BRM, BRG1, BAF 155. Korelacji tych nie potwierdzono dla grupy chorych z nie-eozynofilowym PZZP.

W rozdziale 13. PODSUMOWANIE I WNIOSKI Doktorantka sprecyzowała 9 wniosków, tematycznie odpowiadających założonym celom pracy, w tym 6 celom szczegółowym.

Podsumowując, temat przedstawiony w tytule rozprawy na podstawie cyklu publikacji został w niej właściwie postawiony i prawidłowo zinterpretowany. Doktorantka starannie zgłębiła istotę zagadnienia, właściwie przeprowadziła i zinterpretowała wyniki badań.

Jako osiągnięcia naukowe na rozprawę doktorską Autorka wybrała cykl trzech publikacji pod zbiorczym tytułem: „**Funkcja kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF oraz inne aspekty molekularne w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych**”.

Jednocześnie autorka przedstawiła artykuły doniesienia naukowe tematycznie związane z rozprawą doktorską, które ukazały się w pismach: *Otolaryngologia, Advances in Clinical and Experimental Medicine, Acta Otorhinolaryngologica Italica*, w latach 2019-2021. Wszystkie prace są wieloautorskie, niemniej jednak z pisemnych oświadczeń pozostałych autorów, a także z faktu, że Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech artykułach wynika, że pełniła ona kluczową rolę w powstawaniu tych prac.

Cykl publikacji wpisuje się w nurt badań nad nowoczesną diagnostyką i leczeniem schorzenia jakim jest przewlekłe zapalenie zatok przynosowych oraz aspekty diagnostyki tego schorzenia jak również efektywności proponowanego choremu leczenia zachowawczego miejscowego. Prace poruszają zagadnienie o istotnym walorze praktycznym i poznawczym, pozwala na ocenę efektywności leczenia miejscowego w kontekście kontynuacji leczenia po wykonanych uprzednio zabiegach operacyjnych. Właśnie określenie dalszego postępowania pooperacyjnego w przypadku zastosowania zabiegów operacyjnych nosa i zatok przynosowych jest wiodącym tematem wielu doniesień w piśmiennictwie krajowym oraz światowym. Co należy choremu zaproponować po wykonanym zabiegu endoskopowym FESS jest pytaniem bardzo aktualnym i istotnym w obecnych schematach leczenia przewlekłego zapalenia zatok przynosowych występujących bez lub ze zmianami polipowatym jam nosa.

W prowadzonych przez Doktorantkę badaniach podjęto oceny skuteczności leczenia operacyjnego oraz farmakologicznego poprzez korelację uzyskanych wyników z danymi klinicznymi tj. SNOT-22, endoskopię nosa, skalą CT Lund-Mackay, liczbą wykonywanych zabiegów operacyjnych nosa/zatok przynosowych, używania leków sterydowych donosowych oraz leków sterydowych doustnych.

4. Ocena wykorzystanych materiałów źródłowych.

Bibliografia w publikacjach jest bogata; przedstawiono 66 pozycji piśmienniczych, Doktorantka wykorzystuje zarówno piśmiennictwo polskie, jak i zagraniczne. Cykl publikacji został oparty na trafnie dobranych materiałach źródłowych. Materiały statystyczne są także dobrane dobrze, adekwatnie do ilustrowanego problemu; są jednolite i nieprzypadkowe.

5. Syntetyczna ocena rozprawy, jej komentarza oraz konkluzja końcowa.

Rozprawa doktorska lek. med. Katarzyny Kowalik stanowi oryginalne rozwiązanie problemu jakim są diagnostyka i leczenie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Przedmiot, który stanowi również zagadnienie przedstawione w cyklu publikacji został właściwie przeanalizowany, co świadczy o umiejętności zbudowania koncepcji i rozwiązania problemu naukowego.

Cele zostały zawarte w podrozdziale materiał i metody.

Przedstawiono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz cykl publikacji są dobrze dopracowane i dobrane oraz tworzą logiczną całość.

Cykl publikacji dołączony do zasadniczej części rozprawy doktorskiej daje podstawy do stwierdzenia, że Autorka posiada ogólną, uporządkowaną wiedzę zarówno teoretyczną jak i praktyczną w diagnostyce i leczeniu schorzeń zatok przynosowych oraz pozwala na pozytywną ocenę jej warsztatu badawczego. Autorka wykazała umiejętności selekcji i doboru źródeł adekwatnych do opisywanych zagadnień; dowiodła też, że potrafi stosować metody analizy i syntezy naukowej.

Całość rozprawy doktorskiej świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana rozprawa doktorska lek. med. Katarzyny Kowalik pt. „Funkcja kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF oraz inne aspekty molekularne w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych” **spełnia wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy we względu na bardzo trafny dobór tematyki pracy doktorskiej, bardzo aktualny z punktu widzenia kliniki przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Wszechstronne stosowanie przez Doktorantkę technik histologicznych oraz z zakresu hodowli komórkowej pozwala na potwierdzenie pozytywnej oceny jej warsztatu badawczego. Należy podkreślić bardzo przejrzyste przygotowanie manuskryptu.**

073027.5
mgr inż. Andrzej G. Rylisz
specjalista biopłodności
tel. 0501 19-51-50
Rylisz