



dr hab. n. med. Kornel Szczygielski

Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej

z Kliniknym Oddziałem Chirurgii Czaszkowo- Szcękowo- Twarzowej

Wojskowy Instytut Medyczny – Państwowy Instytut Badawczy

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej

Tytuł pracy: „Rola szlaku $TGF\beta 1/Smad2/3$, CNPazy i małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych”

na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Promotor: dr hab. n. med. Mirosław Szczepański

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Piszczatowskiej dotyczy niezwykle aktualnego i złożonego problemu przyczyn powstawania przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (PZZP), jednostki chorobowej o znaczącym wpływie na jakość życia pacjentów oraz znacznym udziale w kosztach opieki zdrowotnej. Patogeneza tego schorzenia pozostaje wciąż nie w pełni poznana, a badania nad jego molekularnymi mechanizmami mogą otworzyć nowe perspektywy terapeutyczne. Temat podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w ten nurt i łączy nowoczesne metody badawcze z praktycznym zastosowaniem klinicznym.

Rozprawa ma charakter pracy opartej na cyklu publikacji i zawiera dwa artykuły poglądowe oraz jedną pracę oryginalną. We wszystkich publikacjach mgr Katarzyna Piszczatowska występuje jako pierwsza autorka (w jednym jako równorzędna pierwsza autorka), co świadczy o jej dominującym udziale w przygotowaniu, prowadzeniu oraz opracowaniu badań. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o uznanym dorobku naukowym.

Szczegółowe dane dotyczące publikacji:

1. **Piszczatowska K, Czerwaty K, I wsp.** "The emerging role of small extracellular vesicles in inflammatory airway diseases". *Diagnostics*.2021
2. **Czerwaty K, Piszczatowska K, I wsp.** "Immunological aspects of chronic rhinosinusitis". *Diagnostics*. 2022
3. **Piszczatowska K, Czerwaty K, I wsp.** „Evaluation of CNPase and TGFB1/Smad signaling pathway molecule expression in sinus epithelial Tissues of patients with chronic rhinosinusitis with (CRSwNP) and without nasal polyps(CRSsNP)". *Journal of Personalized Medicine*. 2024

Układ rozprawy jest przejrzysty i odpowiada standardom przewidzianym dla tego typu prac: zawiera wstęp, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, cele i założenia pracy, przegląd literatury, kopie publikacji, podsumowanie i wnioski, a także dokumentację

formalną w tym opinii komisji bioetycznej oraz oświadczenia współautorów. Pod względem edytorskim praca prezentuje się bardzo dobrze i jest napisana poprawnym językiem naukowym.

W bardzo rozbudowanym Wstępie Doktorantka kompleksowo omawia współczesny stan wiedzy dotyczący immunologii PZZP. Przedstawia szczegółowo definicje, objawy oraz charakterystykę tej heterogennej jednostki chorobowej, wskazując na jej dwie formy kliniczne oraz podziały fenotypowe i endotypowe. Omawia budowę anatomiczną, funkcje zatok przynosowych oraz nabłonka oddechowego. Przybliżając patogenezę PZZP Autorka podkreśla znaczenie nabłonka górnych dróg oddechowych, stanowiącego rolę swoistego filtru i strukturalnej oraz funkcjonalnej bariery ochronnej działającej dzięki współdziałaniu wielu, złożonych mechanizmów. Przedstawione zostają fazy i interakcje czynników biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, przegląd substancji oraz komórek biorących udział w zwalczaniu patogenów wnikaających w obręb błony śluzowej. Podkreślony zostaje rosnący udział cytokin typu 2 (IL-4, IL-5, IL-13) w rozwoju choroby, jak również znaczenie eozynofilii tkankowej, przebudowy nabłonka i angiogenezy. Doktorantka zauważa rolę przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko IL-5 w leczeniu PZZP z polipami nosa w postaci Mepolizumabu, nie wspomina jednak o innych przeciwciałach monoklonalnych, których skuteczność wykazano na tyle, że znalazły się nawet w programach lekowych dostępnych chorym w Polsce. W kolejnych rozważaniach wspomniane zostają rola mikrobiomu i biofilmu oraz zmian strukturalnych w warstwie nabłonka oddechowego oraz warstwy podnabłonkowej, które w badaniach histopatologicznych wykazują różnice u chorych PZZP z polipami nosa i bez nich. W osobnym podrozdziale opisano rolę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych- zwanych również egzosomami- uwalnianych do płynów ustrojowych wraz bagażem pod postacią białek, lipidów, receptorów, kwasów nukleinowych i różnego rodzaju metabolitów. Ze względu na niesiony przez nie ładunek molekularny stanowią one ostatnimi czasy przedmiot żywego zainteresowania badaczy, w tym również zajmujących się patogenezą PZZP, ze względu na ich obecność zarówno w obrębie błony śluzowej, popłuczynach z nosa i zatok, jak i we krwi obwodowej. W literaturze wykazano istotną rolę egzosomów w przebiegu takich procesów jak angiogeneza, proliferacja komórkowa, przebudowa tkankowa czy mechanizmy obronne opisując wyniki badań na materiale klinicznym pobranym od chorych z PZZP.

Szczególną uwagę Doktorantka poświęca roli szlaku TGF β 1/Smad2/3 w patogeniezie PZZP. W oddzielnym rozdziale Wstępu omówione jest działanie cytokiny TGF β 1, której funkcja zależy od rodzaju wydzielających ją komórek, środowiska i okoliczności, w których działa. W sposób czytelny Autorka opisuje procesy aktywacji, funkcje i powiązania tego białka z receptorami oraz przenoszenie sygnału z cytoplazmy do jądra komórkowego, w którym następuje regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych m.in. za ekspresję białek tworzących połączenia międzykomórkowe oraz przekształcenia fibroblastów nosowych w miofibroblasty i innych modyfikacji tkankowych zachodzących w przebiegu PZZP. W kolejnych podrozdziałach Autorka sygnalizuje znaczącą rolę adenozy- endogennego nukleozydu biorącego udział w wielu fizjologicznych i patologicznych procesach wewnątrz i zewnątrzkomórkowych, oraz ścieżek molekularnych powiązanych z cAMP(cyklicznym monofosforanem) w patogeniezie chorób zapalnych górnych dróg oddechowych. W przystępny sposób- również za pomocą obrazowych rycin- Doktorantka wyjaśnia jak dochodzi do powstania adenozy- z rozpadu mRNA przy udziale CNPazy jako enzymu metabolizującego, której- jak wykazano w

literaturze- obniżenie stężenia może prowadzić do większego wydzielania opisanych wcześniej- egzosomów- nośników sygnałów zapalnych i mediatorów międzykomórkowych biorących udział w patogenezie PZZP.

Całość odbioru i przystępności obszernego tekstu Wstępu może zaburzać mnogość skrótów i brak ich rozwinięcia w tekście, takich jak: ERK, p38 MAPK, JNK, NF- κ B, PI3K/ AKT lub JAK/STAT. Na obronę autorki niech świadczy jednak fakt prawidłowego ich objaśnienia w Wykazie skrótów oraz w tekstach załączonych kopii publikacji.

Na podstawie opisanych we Wstępie danych literaturowych opisujących rolę układu immunologicznego, białek TGF β 1, Smad2, pSmad3, CNPazy oraz egzosomów, w schorzeniach związanych z przewlekłym stanem zapalnym i przebudową tkankową Doktorantka stawia hipotezę, że czynniki te uczestniczą również w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych.

Definiuje cele pracy jako:

1. Ocena roli układu immunologicznego i egzosomów w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami i bez polipów.
2. Ocena ekspresji nabłonkowej białek TGF β 1, Smad2, pSmad3, CNPazy oraz jej znaczenia klinicznego jako potencjalnego biomarkera u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami i bez polipów.

Omówienie załączonych publikacji

Pierwsza z publikacji była pracą oryginalną badającą rolę szlaku TGF β 1, Smad2, pSmad3, CNPazy u chorych z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych. Badania przeprowadzono na próbkach tkanek pochodzących od 43 pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych w tym 20 z polipami nosa (PZZPzPN) i 23 pacjentów bez polipów, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia operacyjnego. Kryteria kwalifikacji do grupy badawczej były jasno określone, a w analizach uwzględniono dane kliniczne pacjentów, w tym przebieg choroby oraz wskazania do zabiegu. Grupa kontrolna składała się z 8 pacjentów poddanych operacjom nosa z innych wskazań, bez cech zapalenia zatok. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę lokalnej komisji bioetycznej. Wszyscy chorzy wypełnili kwestionariusz SNOT-20 oraz zostali zbadani pod kątem występowania objawów zgodnie z EPOS 2020. Analizy stężenia białek TGF β 1, Smad2, pSmad3, CNPazy przeprowadzono stosując metodę immunohistochemiczną, w celu oceny koekspresji TGF β 1 oraz CNPazy zastosowano analizę immunofluorescencyjną. Za pomocą analizy immunohistochemicznej Autorzy pracy wykazali dodatnią ekspresję TGF β 1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku oddechowym oraz naciekach zapalnych zlokalizowanych w warstwie podnabłonkowej u pacjentów ze wszystkich trzech grupach: PZZPbP, PZZPzP i grupy kontrolnej. Poziom ekspresji Smad2 był wyższy w przypadku pacjentów z PZZPbP niż PZZPzP i kontrolnych, pSmad3 i TGF β 1 wyższy u PZZPzP niż kontrolnych, natomiast poziom CNPazy był niższy u pacjentów PZZPbP niż kontrolnych. Dodatkowo, zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją CNPazy i

TGFβ1 u pacjentów PZZPbP, co skłoniło Autorów do wykonania barwienia immunofluorescencyjnego, w którym zauważono kolokalizację obu białek w obszarze nabłonka. Uzyskane wyniki sugerują możliwe współdziałanie ścieżki TGFβ1 i CNPazy nieopisane do tej pory w przypadku patogenezy PZZP. Jak zauważa Doktorantka, jak dotychczas nikt w piśmiennictwie światowym, nie wykazał ekspresji CNPazy w nabłonku górnych dróg oddechowych pochodzącym z zatok przynosowych, więc doniesienia te można traktować jako pionierskie.

W toku badań zaobserwowano także podwyższony poziom eozynofili we krwi u chorych z polipami w porównaniu do grupy kontrolnej oraz jej pozytywną korelację z TGFβ1. Podobnie podwyższony poziom eozynofili obecnych we krwi korelował dodatnio z poziomem ekspresji nabłonkowej CNPazy zarówno w przypadku chorych PZZP z polipami nosa, jak i bez polipów. W wyniku analizy statystycznej wykazano również pozytywną korelację pomiędzy nabłonkową ekspresją TGFβ1, Smad1 i pSmad3, a wybranymi symptomami PZZP, co może sugerować ich rolę w przebudowie tkanki i znalazło istotne statystycznie przełożenie na samopoczucie chorych.

Wyniki pomiarów przeprowadzonych przez Autorów badania wykazały pozytywną ekspresję TGFβ1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku oddechowym pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok oraz grupy kontrolnej, lecz zaobserwowane statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji poszczególnych antygenów pomiędzy grupami pacjentów, mogą sugerować ich możliwe odmienne zaangażowanie w poszczególnych endotypach choroby. Jednak wnioskowanie, że CNPaza, może przyczyniać się do regulacji wydzielania egozomów, które de facto nie były przedmiotem obecnego badania uważam za zbyt śmiało rozważania teoretyczne, które należałoby udowodnić w toku kolejnych, rzetelnych analiz laboratoryjnych. Nie można zaprzeczyć jednak słuszności domniemywań, że przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania mogą otworzyć ścieżkę do odkrycia niepoznanych dotąd mechanizmów patogenezy choroby, ustalenia specyficznych dla danego endotypu biomarkerów i w przyszłości skuteczniejszych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych.

W pierwszym z artykułów poglądowych załączonych w dysertacji Doktorantka wraz z zespołem, obszernie opisuje doniesienia literaturowe na temat immunologicznych aspektów PZZP. Podkreślając złożoność procesów prowadzących do różnych form endotypowych tego schorzenia. W następujących po sobie, systematycznie opisywanych podrozdziałach artykułu przedstawiano kolejno: strukturę i funkcje nabłonka dróg oddechowych, jako pierwszej linii obrony zatok przynosowych, jego elementy wydzielnicze, chemosensoryczne właściwości komórkowe, znaczenie receptorów TLRs i roli hipoksji w powstawaniu polipów nosa. Opisano w sposób czytelny etapy zarówno odpowiedzi wrodzonej oraz role biorących w niej udział komórek odpornościowych takich jak: limfocyty, neutrofile, monocyty, makrofagi, bazofile, komórki tuczne i eozynofile, jak i odporności nabytej z udziałem komórek dendrytycznych, komórek T i B. Przedstawiono również inne aspekty patogenezy PZZP z uwzględnieniem roli protein HMGB1, procesu remodelingu tkankowego oraz neurozapalenia i roli egzozomów, jako nowopojawiających się aspektów w badaniach nad mechanizmami chorób zapalnych dróg oddechowych. Części opisowe uzupełnione są o ciekawe ryciny, w których w sposób graficzny Autorzy przedstawili mechanizmy zaangażowane w patogenezę PZZP, co ułatwia orientację w tych niezwykle złożonych procesach. Na uwagę zasługuje fakt bardzo obszernej

bibliografi, zawierającej ponad 160 pozycji, co świadczyć może o ogromie pracy włożonej w przygotowanie artykułu.

Drugi artykuł przeglądowy stanowi niejako kontynuację rozważań zawartych w poprzedniej pracy poglądowej i skupia się na podsumowaniu dotychczasowej wiedzy o roli egzosomów w patogenezie PZZP. W pracy dokonano szerokiej analizy literatury dotyczącej biogenezy, klasyfikacji, funkcji i potencjału diagnostycznego tych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w chorobach zapalnych górnych dróg oddechowych. Autorzy wskazali, że pęcherzyki te uczestniczą w transportowaniu cytokin, RNA, białek i innych cząsteczek zaangażowanych w odpowiedź zapalną, a ich zawartość może różnić się w zależności od rodzaju komórek źródłowych oraz stanu zapalnego. Szczególnie podkreślono możliwość wykorzystania egzosomów jako biomarkerów w diagnostyce PZZPzPN oraz jako nośników terapeutycznych w przyszłości. Przegląd uwzględniał również ograniczenia obecnych metod izolacji i charakterystyki pęcherzyków, zwracając uwagę na potrzebę standaryzacji protokołów badawczych. Artykuł został dobrze udokumentowany cytatami z obszernej, aktualnej literatury i opatrzony licznymi rycinami i tabelami podsumowującymi wyniki badań oryginalnych z ostatnich lat. Jest to wartościowy wkład w rozwój wiedzy w tej dziedzinie i stanowi cenne uzupełnienie części eksperymentalnej dysertacji. Opisanie zagadnienia to obszar intensywnie badany, a publikacja może służyć jako punkt wyjścia do dalszych analiz i planowania przyszłych projektów badawczych.

W części "Podsumowanie i wnioski" Autorka pokrótce przedstawia informacje zawarte w załączonych pracach przeglądowych oraz zwraca uwagę na szczególną rolę ścieżek TGF β /Smad i HMGB1/RAGE oraz egzosomów, które zaangażowane są w przebudowę tkanki towarzyszącą PZZP. Uzasadnia dalsze zainteresowanie i konieczność badań nad wyżej wymienionymi czynnikami i mechanizmami, które formułuje w postaci celów do niniejszej rozprawy. O ile cel główny nr.2, czyli ocena ekspresji nabłonkowej białek TGF β 1, Smad2, pSmad3, CNPazy oraz jej znaczenia klinicznego jako potencjalnego biomarkera u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami i bez polipów zrealizowano na podstawie badań własnych, mających szansę być bardzo wartościowymi i rokuszącymi na przyszłość ciekawymi kierunkami dalszych prac badawczych, o tyle cel nr.1, czyli ocena roli układu immunologicznego i egzosomów w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami i bez polipów został zrealizowany na podstawie przeglądu literatury światowej, co zachęca do stawiania nowych hipotez badawczych i projektowania dalszych badań oryginalnych.

Jak słusznie Doktoantka zauważa, w celu potwierdzenia potencjalnej możliwości zastosowania uzyskanych wyników dotyczących badanych antygenów jako biomarkerów choroby, należy przeprowadzić analizę z włączeniem znacząco większej ilości chorych oraz pacjentów stanowiących grupę kontrolną.

Podsumowanie:

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Katarzyny Piszczatowskiej reprezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, metodologiczny oraz edytorski. Oparta na solidnym warsztacie badawczym, dostarcza nowych i istotnych informacji dotyczących patomechanizmów PZZP oraz wskazuje potencjalne nowe kierunki terapii. Szczególne uznanie należy się za

nowatorskie podejście do kierunku badań i pionierskie w tej dziedzinie doniesienia własne, mające szansę stać się podstawą do ich kontynuacji w przyszłości.

Uważam że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)

Na podstawie powyższej oceny wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Piszczatowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to mgr Katarzyna Piszczatowska, the author of the recommendation.