

Warszawa, 17 listopada 2014 roku

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr biotechnologii  
Sylwii Smolińskiej**

Przedstawiona mi do recenzji praca „Poszukiwanie molekularnych podstaw do wykorzystania sygnału histaminowego i receptorów histaminowych H1R, H2R i H4R w przebiegu przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit” wpisuje się w nurt współczesnych badań nad patogenezą oraz możliwościami terapeutycznego oddziaływania w chorobach zapalnych jelit – chorobie Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG). Należy podkreślić, że patogenezą tych chorób nie została dotychczas szczegółowo poznana i stąd też efekty leczenia nie są zadowalające. Dotyczy to leczenia dietetycznego, farmakologicznego i chirurgicznego obu schorzeń. Również leczenie biologiczne, choć bardziej skuteczne w ChL-C, nie przyniosło spodziewanych efektów. Według ostatnich doniesień, pochodzących z NICE (National Institute for Health and Care Excellence), nie będzie rekomendowane w najbliższej przyszłości leczenie przeciwciałami monoklonalnymi anty-TNF w WZJG.

Choroby zapalne jelit dotyczą ludzi w młodym wieku, głównie w krajach rozwiniętych i oprócz skutków medycznych, stanowią też obciążenie

ekonomiczne w kontekście kosztów bezpośrednich, pośrednich i niewymiernych.

Histamina i receptory histaminowe (rodopsyno-podobna rodzina receptorów zależnych od białka G) spełniają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Uwolniona z tkanek histamina wiąże się ze swoistymi receptorami, a następnie ulega przemianie do nieczynnych produktów. Działanie histaminy jest uwarunkowane pobudzeniem receptorów  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  i  $H_4$ .

Relatywnie najlepiej została poznana i udokumentowana rola histaminy w kształtowaniu zapalenia alergicznego, wynikająca z pobudzenia receptora  $H_1$  i obserwowana w alergii wziewnej, astmie i anafilaksji.

Efektem pobudzenia receptorów  $H_2$  jest, między innymi, stymulowanie wydzielania soków trawiennych w żołądku. Receptory  $H_3$  znajdują się w OUN i stanowią drogę neuroprzekaźnikową.

Najślabiej poznany jest receptor  $H_4$ , choć interesującym kierunkiem badań jest poszukiwanie związku aktywności tego receptora z chorobami autoimmunologicznymi. Procesy zapalne, regulowane przez histaminę wymagają współdziałania limfocytów  $TH_1$ ,  $TH_2$ ,  $TH_9$ ,  $TH_{17}$ ,  $TH_{22}$  oraz T-reg.

Patogeneza nieswoistych zapaleń jelit jest nieznana, ale badania wskazują, że jednym z czynników patogenetycznych może być występująca w przewodzie pokarmowym flora bakteryjna. Bakterie te posiadają struktury, określone jako PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Komórki człowieka, w tym makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B i wiele innych, rozpoznają te wzorce przy pomocy wyspecjalizowanych receptorów (PPRS- pattern

recognitions receptors), w skład których wchodzi między innymi receptory Toll-podobne.

Brak efektywnego leczenia w chorobach zapalnych jelit powoduje, że poszukuje się nowych mechanizmów zapalenia, wzajemnych powiązań pomiędzy komórkami czynnymi immunologicznie a wydzielanymi przez te komórki mediatorami. Dlatego wybór tematu i podjęcie badań, które mają na celu zbadanie receptorowego działania histaminy na odpowiedź immunologiczną przeciw bakteriom w chorobach nieswoistych jelit uważam za ważne i oryginalne.

W tym miejscu należy podkreślić, że Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, kierowana przez promotora pracy prof. Marka Jutela posiada ogromne doświadczenie w badaniach nad histaminą i jej receptorami, a na szczególne zainteresowanie zasługuje praca „Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors”, opublikowana na łamach Nature w 2001 roku, która powstała w kooperacji z naukowcami ze Szwajcarii.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest w mojej ocenie kontynuacją badań nad rolą histaminy i jej receptorów w kształtowaniu procesów zapalnych.

We wstępie doktorantka wprowadza czytelnika w problem nieswoistych chorób zapalnych jelit, pokazuje mechanizmy rozpoznawania mikroorganizmów przez receptory Toll-podobne oraz mechanizm działania histaminy i receptorów histaminowych.

Doktorantka wyznaczyła sobie cztery cele pracy:

1. Zbadanie ważności sygnału uruchamianego przez histaminę poprzez jej receptory (H1R, H2R, H4R) na poziomie ogólnoustrojowym i lokalnym, a doświadczenie te zostało wykonane na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej.
2. Zbadanie metabolizmu histaminy na poziomie molekularnym przez zmierzenie ekspresji genów kodujących enzymy szlaku syntezy lub szlaku rozkładu histaminy.
3. Aktywacji nieswoistej odpowiedzi przy udziale receptorów Toll-podobnych.
4. Ocenę równowagi pomiędzy komórkami efektorowymi TH1/TH2/TH17.

Do badań zostały wykorzystane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs) oraz wycinki z jelit, pochodzące z miejsc zmienionych zapalnie oraz makroskopowo ze zdrowej tkanki. W badaniu ekspresji genów receptorów histaminowych, ekspresji receptorów Toll-podobnych wykorzystano metodę RT-PCR. Używając aparaturę –Bioplex dokonano stymulacji ligandami dla receptorów Toll-podobnych, co pozwoliło na ocenę cytokin w supernatancie pochodowlanym. Populacje limfocytów Th1, Th2, Th17 zidentyfikowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Zastosowane metody są współczesne i prawidłowo dobrane do zaplanowanych celów badawczych.

Doktorantka wykazała, że ekspresja genów H1R i H4R jest obniżona w PBMCs w obu chorobach, a jednocześnie zwiększona ekspresja genów H1R, H2R, H4R jest obserwowana w miejscach zmienionych chorobowo u chorych na WZJG, a H2R i H4R w CHL-C. Występują też istotne różnice w odsetku komórek ekspresjonujących receptory histaminowe. Oznacza to, że u chorych na nieswoiste zapalenia jelit występuje zaburzenia ekspresji receptorów H1R i H4R

w komórkach krwi obwodowej, a w miejscach, toczącego się zapalenia zaburzenia ekspresji na poziomie genetycznym H1R, H2R i H4R. U chorych z WZJG H2R koreluje z TNF-alfa, a H4R z ekspresją genu dla IFN-gamma. Tym zjawiskom towarzyszy zmniejszenie metabolizmu histaminy w chorobach zapalnych jelit. W odpowiedzi immunologicznej uczestniczą receptory –TLR-6 i TLR-9. Bardzo ciekawe wnioski płyną z oceny komórek efektorowych TH1/Th2/Th17. Doktorantka wykazała bowiem udział limfocytów pomocniczych TH1 ( $CD3^+CXCR3^+T\text{-}beta^+IFN\text{-}gamma^+$ ) i limfocytów Th17 ( $CD3^+CCR6^+ROR\text{-}gamma^+CD161^+IL\text{-}17^+$ ). Podważyła natomiast dotychczasowe obserwacje o istotnej roli limfocytów Th2 w kształtowaniu WZJG.

Jest to niezwykle interesująca, trudna metodologicznie praca badawcza. Wyniki tej pracy pomagają w zrozumieniu patogenezы nieswoistych zapalnych chorób jelit, a także wytaczają ciekawe kierunki dla dalszych badań. Szczególnie chciałabym podkreślić wartość łącznej oceny komórek czynnych immunologicznie, znajdujących się w krwiobiegu i w miejscach toczącego się zapalenia. Nie jest to pierwsze doniesienie, w którym pokazano (tu na przykładzie receptorów histaminowych) odmienną regulację immunologiczną w zależności od pochodzenia materiału biologicznego, który jest oceniany. Wskazuje to na konieczność kompleksowego podejścia do takich analiz, co zostało w tej pracy pokazane.

Zwraca uwagę ciekawy sposób omówienia wyników, przypisanych oddzielnie do każdej hipotezy badawczej w powiązaniu z wnioskami ogólnymi i szczegółowymi. W przyszłości wyniki badań mogą mieć znaczenie dla praktyki lekarskiej, o ile zostaną potwierdzone na większej grupie badanych osób i zostaną określone możliwości terapeutycznego zastosowania np. blokerów dla wybranych receptorów histaminowych.

Praca ma układ typowy dla dysertacji na stopień doktora nauk medycznych, zawiera 136 stron tekstu, 54 ryciny, 8 tabel. W pracy znajduje się odniesienie do 135 pozycji aktualnego piśmiennictwa angielskojęzycznego.

Nie stwierdzam też uchybień formalno-językowych, stylistycznych i interpunkcyjnych.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca jest oryginalna, stanowi istotny wkład do światowych badań naukowych nad problemami immunologicznymi w nieswoistych chorobach zapalnych jelit.

Pani Sylwia Smolińska jest magistrem biotechnologii, ukończyła studia doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Aktywnie uczestniczy w konferencjach oraz zjazdach krajowych i międzynarodowych. Jest współautorem 7 publikacji, z których wszystkie posiadają wysoki współczynniki oddziaływania. Łączny IF wynosi 19,7. Należy zaznaczyć, że taka wartość współczynnika oddziaływania jest w wielu uczelniach wystarczająca do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn.zm).

Wnoszę, więc do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr biotechnologii Sylwii Smolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.

Z poważaniem  
Karina Jahnz-Różyk

Prof. dr hab. med.  
**Karina Jahnz-Różyk**  
spec. chorób płuc,  
alergologii i immunologii klinicznej  
30-061 Wawa, ul. Szkoły Ofiar 4 m. 52  
Nr ZUS 9289163