

Łódź, 12 sierpnia.2023 r

Dr hab. Agnieszka Krupa
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wolak pt. „Wpływ histaminy na czynność miofibroblastów izolowanych z ziarniny ran”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Wolak stanowi cykl spójnych tematycznie trzech publikacji o sumarycznym IF=6,629, co odpowiada 115 punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. Zbiór publikacji składający się na niniejszą rozprawę doktorską przewyższa podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi zgodnie z Uchwałą nr 30/2017 z dn. 27 stycznia 2017 r Senatu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem w każdej z prac, co sugeruje Jej wiodącą rolę w prezentowanych badaniach.

Rozprawa doktorska dotyczy zagadnień związanych z gojeniem się ran, czyli procesem mającym na celu przywrócenie ciągłości uszkodzonego narządu poprzez wytworzenie blizny. Jest to proces wieloetapowy, na który składają się następujące fazy: hemostaza, stan zapalny, migracja i proliferacja komórek, synteza białek, a w końcu przebudowa i obkurczenie rany. **Opis rozprawy doktorskiej** przygotowanej w oparciu o dorobek publikacyjny składa się z kilku elementów takich jak: „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i Metody”, „Wyniki”, „Podsumowanie i wnioski” oraz „Wniosek końcowy”. **W części wstępnej** pracy Doktorantka scharakteryzowała sytuację, w której postępowi cywilizacji towarzyszy wydłużenie życia ludzi, ale jednocześnie wzrost liczby cierpiących na choroby przewlekłe, takie jak cukrzyca. Trudno gojące, a wręcz niegojące się, rany u osób starszych i chorych stanowią duży problem wpływający na jakość życia i zdrowie pacjentów, a dodatkowo jest ogromnym wyzwaniem ekonomicznym.

Mając na uwadze potrzebę prowadzenia badań w celu pogłębienia wiedzy o mechanizmach zachodzących w czasie procesu gojenia, a na dalszych etapach wprowadzenia zmian w metodach leczenia ran przewlekłych, Doktorantka podjęła się realizacji tematu.

W oparciu o wcześniejsze badania Autorka rozprawy doktorskiej **sformułowała cel pracy**, w którym podjęła się sprawdzenia roli histaminy w regulowaniu procesu gojenia ran, a dokładnie jej wpływu na aktywność metaboliczną komórek - miofibroblastów, w tym wydzielanie przez nie kolagenu i czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1). Ponadto, Doktorantka określiła udział receptorów histaminowych w regulacji czynności badanych komórek.

Pani mgr Monika Wolak zastosowała w pracy bardzo ciekawy model badawczy, a doświadczenia prowadzone przez Nią miały charakter badań *ex vivo*. Komórki zastosowane w pracy zostały pobrane z ran zwierząt (szczury rasy Wistar) poddanych, około 30 dni wcześniej, zabiegowi wszczepienia siatek polipropylenowych, podskórnym w okolicy łędzwiowej w celu wywołania u zwierząt procesu gojenia pooperacyjnego. Hodowle izolowanych komórek szczurzych zawierały fibroblasty, co potwierdzano barwieniem w kierunku alfa aktyny mięśni gładkich, wimentyny, czy desminy będącej istotnym białkiem cytoszkieletu miocytów (Drobnik 2013 ref 15 w Publikacji 1). **W sekcji „Materiały i Metody” pracy nie znalazła się żadna informacja dotycząca potwierdzania typu komórek hodowanych z izolatów z ran zwierząt.** Pomimo tego, że zarówno w Publikacji 1 jak i 2 czytelnik znajduje takie informacje, dodatkowo powinny się one znaleźć w części opisowej rozprawy.

Zaplanowany przez Doktorantkę cykl badań zakładał przeprowadzenie serii stymulacji miofibroblastów histaminą w szerokim zakresie stężeń, a następnie ocenę jej działania na komórki w kontekście ich aktywności metabolicznej, proliferacyjnej i wydzielniczej. Jednocześnie, za każdym razem Doktorantka włączała w układ doświadczalny antagonistę receptora histaminowego H1 (ketotifen), a także alternatywnego agonistę tego receptora w postaci 2-pyridylethylamine dihydrochloride. Doktorantka oceniła także w pracy wpływ histaminy na inne receptory histaminowe stosując w doświadczeniach antagonistów dla: receptora H2 – ranitidine, H3 – ciproxifan i H4 – JNJ777120. Układ kontrolny w pracy stanowiły fibroblasty pobrane z nieuszkodzonej skóry jak i komórki niestymulowane.

Doktorantka zastosowała w pracy różnorodną metodologię: immunoenzymatyczną, biochemiczną czy genetyczną. Wykazała się także dużą zdolnością do pracy z układami komórkowymi, a należy mieć na uwadze, że zastosowany model badawczy nie był prosty. Nasuwa

się pytanie czy Doktorantka samodzielnie wykonywała również część *in vivo* i czy uczestniczyła w zabiegach zakładania siatek polipropylenowych zwierzętom?

Wyniki uzyskane i omówione w Publikacji 1, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej wykazały, że histamina pobudza aktywność metaboliczną miofibroblastów izolowanych z ran, natomiast nie oddziałuje na fibroblasty kontrolne, pochodzące z nieuszkodzonej skóry. Podwyższona aktywność metaboliczna miofibroblastów manifestowała się intensyfikacją wydzielania czynnika TGF- β 1 i była zależna od receptora H1 dla histaminy. Co więcej, ekspresja tego receptora na badanych komórkach również wzrastała. Interesujące jest, że Doktorantka nie zaobserwowała zwiększenia się liczby komórek badanych, czyli proliferacji po stymulacji różnymi stężeniami histaminy. Czy w związku z tym możemy sugerować, że komórki te raczej migrują niż proliferują? Czy doktorantka rozważała wprowadzenie do pracy jeszcze jednego testu – testu „gojenia rany”, który jest wyjątkowo przydatny do określania zdolności komórek do migracji?

Wyniki zaprezentowane przez doktorantkę w Publikacji 2 wskazują na prokolagenotwórczy i zależny od receptora H1 wpływ histaminy na miofibroblasty pobrane z ziarniny rany, a zastosowanie inhibitora receptora H1 hamowało wzrost wydzielanego kolagenu. Efekt ten zauważono również wobec komórek pochodzących z nieuszkodzonej skóry. W obliczu uzyskanych wyników należałoby zapytać czy komórki izolowane z pojedynczych osobników hodowane były oddzielnie i w taki sposób włączane w doświadczenia, czy już na etapie izolacji były „pulowane”? Czy uzyskane wyniki są średnią pochodzącą z oddzielnych prób?

W Publikacji 3 Autorka rozprawy doktorskiej podjęła się niejako podsumowania istniejącej wiedzy na temat roli histaminy w procesach gojenia i włóknienia, a publikacja stanowi swego rodzaju przeglądówkę. W pracy Doktorantka omówiła temat gojenia nieco szerzej, uwzględniając wszystkie etapy tego procesu oraz udział innych, niż tylko miofibroblasty komórek. Niezwykle interesujący jest aspekt pochodzenia histaminy w organizmie w czasie trwającego procesu gojenia ran oraz to, że komórki tuczne we wczesnych i późnych etapach reparacji intensyfikują wydzielanie histaminy. Działanie histaminy na proces gojenia jest udokumentowany, jednakże mechanizm jej działania na procesy proliferacji, migracji czy angiogenezy są nadal słabo poznane. Czy doktorantka spotkała się z badaniami dotyczącymi działania histaminy na komórki śródbłonna naczyniowego? W publikacji 3 autorka pisze, że histamina nie tylko intensyfikuje wydzielanie przez komórki czynnika wzrostu TGF- β 1,

ale także czynnika FGF. Czy wiadomo coś na temat zmiany ekspresji receptorów dla FGF na fibroblastach w wyniku działania histaminy?

Opis stanowiący komentarz do trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej został przygotowany starannie pod względem edytorsko-redakcyjnym, jednakże znajdują się w nim pojedyncze błędy, jak na przykład różnie napisana nazwa czynnika TGF- β 1. Doktorantka pisze – TGFbeta1 lub TGF- β 1.

Podsumowując należy stwierdzić, że podlegająca ocenie rozprawa doktorska podejmuje aktualną tematykę, a uzyskane wyniki mają duży potencjał terapeutyczny. Wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą histaminy w regulacji procesów gojenia się ran. **Biorąc pod uwagę powyższe oraz fakt, że rola Doktorantki w publikacjach włączonych w rozprawę doktorską jest wiodąca (pierwsze autorstwo)** stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz U. nr 65 poz.595 z późn zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.


Dr hab. Agnieszka Krupa