

Wrocław, 10. luty 2017.

Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Szymańskiego

pt. „Wpływ pola elektromagnetycznego na ekspresję cytokin immunoregulacyjnych i receptorów szlaku śmierci Fas/FasL w atopowym zapaleniu skóry”

Atopowe zapalenie skóry (AZS) to choroba przewlekła o nawrotowym charakterze. Dla jej przebiegu charakterystyczne są przeplatające się cykle wyciszenia objawów (remisji) z zaostrzeniami objawów (przesuszenie skóry, podrażnienia a nawet rany). Najbardziej uciążliwym objawem AZS jest swędzenie (świąd), którego stopień nasilenia zależy od fazy choroby. AZS towarzyszą również zaburzenia funkcjonowania układu immunologicznego i zmiany w fizjologii i budowie skóry. AZS zazwyczaj rozpoznawane jest we wczesnym dzieciństwie (85% przypadków pojawia się u dzieci przed ukończeniem 5. roku życia), ale zdarza się również, że diagnozowane jest dopiero u osób dorosłych. Szacunkowo przyjmuje się, że około co piąta osoba na świecie cierpi na AZS, z czego atopia częściej dotyczy kobiet niż mężczyzn. Niestety (AZS) to choroba na całe życie, a stosowane terapie nie prowadzą do wyleczeń, a ich efektem jest jedynie okresowe wyciszenie objawów klinicznych.

Z kolei pole elektromagnetyczne (PEM) stanowiące przestrzeń, w której energia elektryczna i magnetyczna przenikają się wzajemnie, towarzyszy nam codziennie. Emitowane z różnych źródeł PEM oddziałuje na organizmy żywe, przy czym nie do końca jest wyjaśniony mechanizm tych działań ani też jego efektywność. Aktualnie fale elektromagnetyczne są wykorzystywane w medycynie. PEM z zakresu mikrofal może wnikać głęboko do wnętrza tkanek, a niesiona energia jest zamieniana na ciepło, powodując wzrost temperatury tkanek czy całych narządów. Leczenie stosowane mają głównie fale o częstotliwości 27MHz (diatermia krótkofalowa) oraz o częstotliwości 2450MHz (diatermia mikrofalowa). Są często stosowane w leczeniu schorzeń ortopedycznych, reumatycznych, dolegliwości bólowych mięśni i stawów. Pole elektromagnetyczne znalazło również zastosowanie w diagnostyce

medycznej i jest wykorzystywane do obrazowania tkanek i narządów przy pomocy rezonansu magnetycznego. Badania ostatnich lat wskazują, że w zależności od częstotliwości i czasu ekspozycji wpływ PEM może być czynnikiem ingerującym w proces różnicowania, wzrostu, podziałów, ruchu, żywotności czy programowej śmierci komórki przez bezpośrednie działanie na receptory nabłonkowego czynnika wzrostu komórek (EGFR) co prowadzi do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych MAPK (*kinaza aktywowana mitogenami*), mTOR (*kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny*) czy PI3K (*kinaza 3-fosfatydyloinozytolu*) biorących udział w w/w procesach komórkowych.

Dlatego też wybrany przez Doktoranta problem naukowy o możliwości ingerowania polem elektromagnetycznym na ekspresję receptorów szlaku śmierci Fas/FasL i zdolność do syntezy i uwalniania cytokin pro- i przeciwzapalnych keratynocytów wyizolowanych od chorych z atopowym zapaleniem skóry, który stanowi rozprawę doktorską, należy uznać za bardzo ważny, aktualny, nowatorski i oryginalny.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Łukasza Szymańskiego obejmuje wraz z wykazem piśmiennictwa i streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów 113 stron maszynopisu. Praca zawiera 2 tabele przedstawiające charakterystykę osób zdrowych (tabela 1) oraz chorych z występującym atopowym zapaleniem skóry (AZS) (tabela 2), od których został pobranych wycinek skóry z okolic przedramienia stanowiący materiał do izolacji keratynocytów. W powyższych tabelach przedstawione zostały informacje dotyczące płci, wieku, wagi, wzrostu oraz współczynnika masy ciała (BMI) osób zdrowych i pacjentów z AZS, u których stopień nasilenia występujących objawów atopowego zapalenia skóry oceniany był przez dermatologa na podstawie wskaźnika EASI (*Eczema Area and Severity Index*) i który u pacjentów ujętych w badaniach wynosił powyżej 20 w skali (0-72). Powyższa dokumentacja jest niezwykle ważna, ponieważ stanowi dokument przedstawiający właściwy dobór osób od których został pobrany materiał badawczy. W części metodycznej dysertacji Autor nie podał informacji czy uzyskał zgodę na pobranie materiału badawczego właściwej Komisji Bioetycznej, co będzie konieczne przy przygotowaniu pracy do druku. Zasadniczą dokumentację naukową dysertacji stanowią 42 ryciny, przy czym 27 rycin przedstawia uzyskane przez Doktoranta wyniki badań, natomiast 14 rycin stanowi w większości własne opracowania graficzne koncepcji naukowych i celów badawczych. Przedstawione w rycinach (2,4,9,10,13 i 14) schematy zostały wykonane przez Doktoranta według jego koncepcji. Powyższe opracowania graficzne zawierają przeprowadzone przez Doktoranta przemyślenia i analizy naukowe podjętego

tematu badawczego. Są wykonane niezwykle sugestywnie i przekonują Czytelnika o dojrzałości i zrozumieniu przez Doktoranta podjętych tez badawczych oraz umiejętności ich udowodnienia przez zaprojektowane układy eksperymentalne. Również 27 rycin (od nr 15-42), które zawierają uzyskane wyniki badań zostały opracowane w sposób bardzo przekonujący i komunikatywny, ponieważ każda rycina składa się z dwóch części; część pierwsza zawiera graficzne przedstawienie uzyskanych wyników badań w postaci wykresu, natomiast część druga stanowi postać tabelaryczną w której zawarte są dane z opracowania statystycznego takie jak różnice średnich, 95% przedział ufności, informację o istotności oraz wartość P.

Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, że wykorzystane przez Doktoranta przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo w liczbie 127 pozycji jest aktualne, ponieważ 111 pozycji piśmiennictwa to oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie zagranicznych w okresie ostatnich 16 lat. Jedynie 5 pozycji piśmiennictwa mają odnośniki do adresów internetowych. W przedstawionym piśmiennictwie w pozycji 113 autorstwa 1) *Biederman i wsp.*, brakuje pełnych danych bibliograficznych, nie zostały podane numery stron. Powyższe jest jedynie uwagą porządkującą, natomiast należy stwierdzić, że wybór cytowanych przez Doktoranta pozycji piśmiennictwa świadczy o Jego bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym do podjętego tematu badawczego.

Przedstawiona dysertacja zawiera wszystkie rozdziały typowe dla prac doktorskich o charakterze eksperymentalnym czyli jest podzielona na standardowe rozdziały obejmujące wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Rozdziały takie jak wstęp, materiał i metody oraz wyniki badań zawierają odpowiednie podrozdziały. Przed częścią opisową pracy umieszczony został bardzo starannie przygotowany spis treści oraz wykaz skrótów pojęć stosowanych w dysertacji. Umieszczenie powyższego wykazu było bardzo celowe i pożądane, ponieważ w istotny sposób ułatwia czytelnikowi wyjaśnienie bardzo licznych skrótów zawartych w tekście. Na końcu dysertacji zostało umieszczone streszczenie w języku polskim i angielski, chociaż w opinii Recenzenta streszczenie powinno być umieszczone przed wstępem co zwyczajowo jest stosowane przy publikowaniu oryginalnych prac twórczych, ponieważ taki skrótowy przekaz pozwala czytelnikowi na poznanie celu badań oraz ich rezultatu końcowego.

Celem badań porównawczych przeprowadzonych *in vitro* na hodowlach pierwotnych keratynocytów wyizolowanych z fragmentów skóry pobranej od osób chorych na atopowe zapalenie skóry i od osób zdrowych było :

1. Porównanie ekspresji cytokin (IL-1 β , IL-17, IL-10, IL-4, IL-12, IL-13, IL-31), chemokiny (IL-8) oraz ekspresji receptora szlaku śmierci Fas oraz jego liganda FasL.
2. Określenie wpływu pola elektromagnetycznego (PEM) na ekspresję w/w cytokin i chemokiny oraz receptora szlaku śmierci Fas i jego liganda FasL.

Przedstawione cele badawcze i wykonane eksperymenty miały pozwolić na udokumentowanie postawionych przez Doktoranta hipotez badawczych, zakładających że ekspozycja keratynocytów człowieka chorego na atopowe zapalenie skóry na działanie pola elektromagnetyczne powoduje obniżenie ekspresji receptorów szlaku śmierci Fas/FasL na powierzchni tych komórek, co prowadzi do zmiany profilu syntezy i uwalniania chemokin i cytokin przez keratynocyty co w konsekwencji może skutkować wyciszeniem odczynu zapalnego występującego w przebiegu atopowego zapalenia skóry.

Trzecim celem badawczym Doktoranta o bardzo istotnym znaczeniu nie tylko poznawczym, ale również aplikacyjnym była ocena wpływu pola elektromagnetycznego na ekspresję badanego szeregu cytokin oraz receptora szlaku śmierci Fas/FasL przez komórki ustalonych linii keratynocytów człowieka HaCaT i PSC-200-010. Wykonanie tych badań miało wykazać czy komercyjnie dostępne ustalone linie keratynocytów człowieka są odpowiednim materiałem do badania biologicznej aktywności PEM oraz czy mogą zastąpić w badaniach *in vitro*, hodowle pierwotne keratynocytów izolowanych z wycinków skóry pobranych od osób zdrowych.

Postawione hipotezy i cele badawcze nie mogłyby zostać w sposób wiarygodny udokumentowane, gdyby nie możliwość wykonania ekspozycji badanych hodowli komórkowych spontanicznych i ustalonych na promieniowanie elektromagnetyczne w specjalnie wykonanej w Zakładzie Ochrony Mikrofalowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii miniaturowej komorze bezechowej wbudowanej w inkubator do hodowli komórkowej z przepływem CO₂. Dostępność tego urządzenia pozwoliła na opracowanie i standaryzację warunków ekspozycji badanych hodowli komórkowych na pole elektromagnetyczne w zakresie: częstotliwości, skutecznego natężenia pola elektromagnetycznego, czasu trwania impulsu, okresu powtarzania impulsów, tempa pochłaniania właściwego oraz czasu trwania ekspozycji. Powyższe świadczy o walidacji

metody ekspozycji hodowli komórkowych na PEM co gwarantuje powtarzalność uzyskanych wyników badań.

Należy stwierdzić, że zakres badań podjętych przez Doktoranta jest bardzo szeroki, o wysokim znaczeniu poznawczym. Doktorant w sposób bardzo rzetelny i logiczny udokumentował wybór stosowanych modeli badawczych. Przedstawione przez Doktoranta wielokierunkowe cele badawcze, wymagały opracowania szeregu układów doświadczalnych, które musiały być zaplanowane i wykonane w odpowiedniej kolejności. W wykonanych układach doświadczalnych Doktorant posługiwał się nowoczesnymi, powtarzalnymi i uznanymi metodami badawczymi z zakresu immunologii i biologii molekularnej, które wymagały opanowania w sposób perfekcyjny technik badawczych stosowanych w pracowniach hodowli komórkowych.

Część teoretyczna dysertacji czyli wstęp został opracowany przez Doktoranta w sposób bardzo rzeczowy, a jego układ i treść świadczy o dużej wiedzy Autora i Jego bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu do podjęcia powyższego tematu badawczego. W tej części rozprawy doktorskiej Autor przedstawił w sposób zwięzły i aktualny informacje o patogenezie z występującymi zaburzeniami funkcji układu immunologicznego w przebiegu atopowego zapalenia skóry oraz jak to schorzenie o podłożu autoimmunologicznym może zmieniać w sposób negatywny jakość codziennego życia pacjentów co często prowadzi do zaostrzeń i nasilenia procesu chorobowego.

W ostatnim podrozdziale wstępu Autor przedstawił informację o aktywności biologicznej pola elektromagnetycznego i możliwości terapeutycznego wykorzystania PEM w klinice człowieka. Szkoda, że Autor przedstawił jedynie pozytywne aspekty oddziaływania PEM na funkcje wybranych komórek czy szlaków metabolicznych. Przecież PEM towarzyszy nam praktycznie w każdej dziedzinie życia, jako naturalne promieniowanie wytwarzane przez Słońce i Ziemię oraz wytwarzane sztucznie stanowiąc efekt rozwoju naszej cywilizacji, co przy tak szybkim rozwoju techniki z każdym rokiem dostarczane są nowe źródła PEM. Oczywiście, należy przyjąć, że pomimo licznych, wieloobszarowych badań, których wyniki są często rozbieżne i trudne do zweryfikowania nie można jednoznacznie określić efektów oddziaływania PEM na organizm żywy tym bardziej, że organizmy żywe zwierząt czy człowieka posiadają dużą zdolność adaptacji do warunków środowiskowych oraz do kompensacji i regeneracji. Na podstawie aktualnej wiedzy można jednak przyjąć, że pierwszym miejscem działania PEM jest błona komórkowa, w której pod wpływem PEM

dochodzi do zaburzeń transportu jonów i innych substancji z i do komórki co niezaprzeczalnie musi mieć wpływ na jej metabolizm i funkcjonowanie, efektem działania PEM jest zmiana stosunku wolnych i związanych fosfolipidów błon komórkowych, PEM hamuje czynność pompy Na^+/K^+ co zaburza transport błonowy jonów czemu muszą towarzyszyć zmiany aktywności wielu enzymów komórkowych. Wiemy również, że PEM powoduje zwiększenie wypływu jonów Ca^{2+} z komórek co może prowadzić do zaburzeń przewodnictwa i przekazywania sygnałów. Kolejno, ekspozycja na PEM indukuje apoptozę komórek w sposób bezpośredni, ale może też wpływać na ten proces pośrednio poprzez wzrost ilości wolnych rodników czy zmianę stężenia jonów wapnia w komórce. Kolejnym czynnikiem świadczącym o niekorzystnym działaniu PEM na organizmy żywe jest obserwowana zwiększona synteza białek szoku cieplnego (Hsp) w komórkach. Oczywiście wszystkie te wpływy PEM na komórki żywe, przekładają się na funkcjonowanie poszczególnych organów i w konsekwencji całego organizmu, jednak efekt będzie zależał od czasu i intensywności napromieniowania PEM. W związku z przedstawionymi w sposób skrótowy faktami, podrozdział wstępu przedstawiający wpływ PEM na organizmy żywe powinien być bardziej rozbudowany, a nie dotyczyć tylko zagadnień istotnych dla przeprowadzonych badań. Uwagi tej nie należy traktować jako krytyki, ale jedynie jako sugestię do wzbogacenia informacji o wpływie PEM na organizm żywy, przy przygotowaniu pracy czy prac z wykonanych badań do druku.

Duże uznanie budzi opracowanie i przedstawienie rozdziału „Cele badawcze” w którym Autor zawarł w sposób bardzo przekonujący zasadność przeprowadzenia zaplanowanych badań oraz ich znaczenie poznawcze a także potencjalnie aplikacyjne w wspomaganie standardowych terapii atopowego zapalenia skóry.

Również bardzo dobrze opracowany został kolejny rozdział dysertacji „Materiał i metody” w którym został przedstawiony schemat przeprowadzonych badań, a następnie w sposób bardzo skrupulatny i przejrzysty przedstawione zostały układy doświadczalne z podaną metodyką wykonanych oznaczeń. Na wstępie powyższego rozdziału zostały przedstawione dane z dokumentacją fotograficzną o prawidłowych pierwotnych keratynocytach człowieka, keratynocytach wyizolowanych ze skóry pacjentów chorych na atopowe zapalenie skóry oraz keratynocytach ustalonych linii komórkowych człowieka PSC-200-010 i HaCaT, następnie przedstawione zostało w sposób opisowy i tabelaryczny charakterystyka osób zdrowych i pacjentów z AZS od których poprano wycinki skóry stanowiące źródło keratynocytów. W tabeli 2 jest błąd w jej opisie, ponieważ przedstawia ona dane dotyczące pacjentów z AZS a nie jak podano ochotników z grupy kontrolnej. Również na str 35 w trzecim wierszu od dołu

powinno być: „Rozkład płci w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry a nie jak napisano w grupie kontrolnej”. Kolejnym podrozdziałem jest wykaz mediów i opis dotyczący prowadzenia hodowli komórkowych.

Należy stwierdzić, przyjęte w pracy układy doświadczalne i zastosowane metody badawcze stanowią gwarancję uzyskania w pełni wiarygodnych wyników. Już z samej liczby mierzonych wskaźników wynika, że badanie zaplanowano na szeroką skalę i uczyniono to bardzo starannie. Wymagało to od Doktoranta nie tylko umiejętności badawczych i laboratoryjnych ale i dużej pracowitości. Dlatego dobór grup i metod badawczych, w tym narzędzi oceny statystycznej uważam za trafny.

Sposób teoretycznego i graficznego opracowania uzyskanych wyników wnosi oryginalny wkład do badań wykonanych *in vitro* nad wpływem pola elektromagnetycznego (PEM) na receptor szlaku śmierci Fas i jego liganda FasL oraz ekspresję cytokin (IL-1 β , IL-17, IL-10, IL-4, IL-12, IL-13, IL-31), chemokiny (IL-8) na keratynocyty wyizolowane od osób zdrowych w porównaniu do w/w wskaźników aktywności keratynocytów pochodzących od pacjentów z kliniczną, czynną postacią atopowego zapalenia skóry. O oryginalności, a przede wszystkim o kompleksowości przeprowadzonych badań świadczy przeprowadzony układ doświadczalnych w którym, w pierwszej kolejności Doktorant oceniał profil i intensywność wytwarzanych cytokin i chemokin oraz ekspresję Fas/FasL w hodowlach pierwotnych keratynocytów wyizolowanych ze skóry osób zdrowych w porównaniu do aktywności tych komórek wyizolowanych od pacjentów z czynną postacią AZS.

Również na duże uznanie zasługuje wysoce prawidłowo opracowany układ doświadczalny i sposób przeprowadzenia badań porównawczych mających na celu wykazanie czy komercyjnie dostępne ustalone linie keratynocytów człowieka (HACaT i PSC-200-010) są odpowiednim materiałem do badania biologicznej aktywności PEM oraz czy mogą zastąpić w badaniach *in vitro*, hodowle pierwotne keratynocytów izolowanych z wycinków skóry pobranych od osób zdrowych.

Należy podkreślić że badane wskaźniki we wszystkich układach doświadczalnych zostały oznaczone w sposób dynamiczny w dwóch punktach czasowych: po 4 i 24 godzinach ekspozycji na PEM.

Również w sposób bardzo rzeczowy, przemyślany, usystematyzowany i rzetelny Doktorant podejmuje w rozdziale „Dyskusja” polemikę z danymi naukowymi na zrealizowany temat badawczy, które zostały opublikowane przez innych autorów z wielu, głównie zagranicznych

ośrodków naukowych. Świadczy to o znajomości aktualnego światowego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień naukowych, ale także o umiejętności właściwej interpretacji zjawisk w oparciu o spostrzeżenia innych badaczy.

Dobrze udokumentowane wyniki badań pozwoliły Doktorantowi na postawienie 7 prawidłowo skonstruowanych wniosków, które stanowią zadowalającą odpowiedź na założone cele badawcze. Natomiast wniosek 8 nie wynika z przeprowadzonych i udokumentowanych eksperymentów, jest jedynie wynikiem przemyśleń naukowych Doktoranta, których odpowiednim miejscem w dysertacji jest rozdział „Dyskusja”. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że maszynopis pracy został przygotowany w sposób bardzo staranny, a praca została napisana bardzo poprawnie pod względem językowym.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr Łukasza Szymańskiego zatytułowana "**Wpływ pola elektromagnetycznego na ekspresję cytokin immunoregulacyjnych i receptorów szlaku śmierci Fas/FasL w atopowym zapaleniu skóry**" jest oryginalnym, nowatorskim osiągnięciem Autora. Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą i potencjalne znaczenie aplikacyjne do wspomagania standardowych terapii stosowanych w atopowym zapaleniu skóry u ludzi. Założone cele badawcze zostały w pełni osiągnięte i przeanalizowane zgodnie z obowiązującymi standardami.

Uważam, że powyższa praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 0365595 z dnia 16.04.2003). Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Łukasza Szymańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również do wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie o nagrodzenie powyższej rozprawy doktorskiej, ze względu na jej oryginalność, nowatorstwo, kompleksowość oraz istotne znaczenie poznawcze i aplikacyjne wykonanych badań.



Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz