



Warszawa, dn. 06. 01. 2022r.

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Piskadło-Zborowskiej
pt. „Ocena wpływu polimorfizmu w receptorach smaku gorzkiego i
węchu na predykcje do rozwoju przewlekłego zapalenia zatok
przynosowych”.**

Przewlekłe zapalenia zatok przynosowych (PZZP) należą do jednych z najczęściej rozpoznawanych schorzeń cywilizacyjnych XXI wieku. Schorzenia te charakteryzują się podobnym przebiegiem klinicznym mimo różnych patomechanizmów, które nie zostały we wszystkich postaciach poznane do końca. Szczególny problem diagnostyczny i terapeutyczny stanowią PZZP odporne na standardowe leczenie zachowawcze i chirurgiczne. W opublikowanych w ostatnich latach pracach dotyczących etiologii PZZP coraz częściej można spotkać sugestię o udziale czynników genetycznych w patogenezie tych chorób.

Jednym z objawów przewlekłych zapaleń zatok przynosowych są zaburzenia w zakresie narządów zmysłów. Dotychczasowe doniesienia opisują obecność wielu receptorów zlokalizowanych w komórkach błony śluzowej nosa i zatok przynosowych. Należą do nich m.in. receptory smaku gorzkiego i węchu. Uważa się, że polimorfizm genotypu receptora smaku gorzkiego – TAS2R38 może przyczyniać się do indywidualnych różnic w predyspozycji do rozwoju i przebiegu PZZP. Natomiast receptor węchu OR1G1, mimo swoich licznych odmian genetycznych i ścisłego powiązania funkcjonalnego z błoną śluzową nosa i zatok, w znanym mi

piśmiennictwie, nie był dotychczas oceniany pod kątem wpływu na predyspozycje do rozwoju PZZP.

W związku z powyższym wybór tematu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Piskadło-Zborowskiej należy uznać za w pełni trafny, praktyczny i wyjątkowo potrzebny dla poznania i lepszego zrozumienia niektórych patomechanizmów zapaleń zatok przynosowych, co w konsekwencji może przyczynić się na opracowania nowych koncepcji leczenia PZZP.

Do przeprowadzenia badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego zarejestrowaną pod numerem KB/130/2015. Badania te zostały zrealizowane we współpracy z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie – kierownik: prof. Janusz Siedlecki.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 126 stron i ma typowy układ dla tego typu opracowań. Podział na rozdziały jest właściwy: wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiał, metody, wyniki badań, omówienie wyników, wnioski. Opracowanie zakończone jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem piśmiennictwa, spisem rycin oraz aneksem.

I tak:

- **Wykaz skrótów:** omówiono użyte w pracy skróty, podając ich pełne rozwinięcia.
- **Spis treści:** zawarto szczegółowy wykaz rozdziałów i podrozdziałów pracy.

III. Wstęp (rozdział I): Doktorantka przedstawiła klasyfikację zapaleń zatok wg najnowszych wytycznych EPOS 2020 oraz omawia dotychczasową wiedzę na temat predyspozycji genetycznych do stanów zapalnych zatok przynosowych. W sposób szczegółowy opisuje budowę i funkcję receptorów smaku i węchu oraz ich udział w patogenezie różnych chorób.

IV. Cele pracy (rozdział 2.) zostały sformułowane następująco:

1. Ocena funkcjonowania zmysłu węchu i zmysłu smaku gorzkiego u chorych z PZZP oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych.
2. Ocena polimorfizmów w receptorach smaku gorzkiego i receptorach węchu u chorych z PZZP i grupie kontrolnej.
3. Ocena korelacji polimorfizmów w obrębie genów receptora węchu OR1G1 i receptora smaku gorzkiego TAS2R38 z nasileniem zmian zapalnych w zatokach przynosowych oraz z nasileniem zaburzeń węchu i smaku u pacjentów z PZZP.
4. Określenie mechanizmu wpływu receptorów narządów zmysłu na stan zapalny błony śluzowej zatok.

W mojej ocenie cele pracy zostały sformułowane precyzyjnie i przejrzystie.

V. Materiał (rozdział 3.): Badaniami objęto 100 osób, w tym 70 chorych z przewlekłym zapaleniem zatok rozpoznany na podstawie kryteriów EPOS 2012/2020 oraz 30 osób grupy kontrolnej z rozpoznany skrzywieniem przegrody nosa, u których w badaniu tomografii komputerowej wykluczono zmiany zapalne w zatokach przynosowych. Pacjentów z badanej grupy podzielono na dwie podgrupy:

Podgrupa I - 40 chorych z PZZP bez polipów nosa.

Podgrupa II - 30 osób z PZZP z polipami nosa.

Rozkład wieku i płci osób biorących udział w badaniu został opisany w tabeli 7. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w rozkładzie płci i wieku pomiędzy grupami.

VI. Metoda (rozdział 4): zawiera szczegółowy opis wszystkich procedur zastosowanych w badaniu. W ocenie podmiotowej Doktorantka wykorzystowała autorską ankietę stworzoną na podstawie wytycznych EPOS 2012/2020. W badaniu przedmiotowym, przeprowadzonym osobiście przez Doktorantkę, oprócz badania laryngologicznego, u każdej osoby zostało przeprowadzone

badanie endoskopowe jam nosa. Badanie tomografii komputerowej zostało ocenione wg obowiązującej skali Lund-Mackay. Badanie olfaktometryczne przeprowadzono metodą Sniffin Sticks. Do badania gustometrycznego smaku gorzkiego wykorzystano roztwór PROP (6-n-propylotiouracyl). Współpracując z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie Doktorantka dokonała oznaczenia polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach kodujących receptor smaku gorzkiego (TAS2R38) oraz receptor węchu (OR1G1). Po wyizolowaniu RNA z tkanek wykonała ilościową analizę genu OR1G1 na poziomie transkryptu. Za pomocą metody immunohistochemicznej (IHC) oceniła w pobranych tkankach błony śluzowej nosa ekspresję białek wykorzystując swoiste przeciwciała anty-TAS2R38.

Zebrane wyniki przeprowadzonych badań poddano analizie statystycznej za pomocą oprogramowania SAS 7.4 (Statistical Analysis System). Przeprowadzono analizę opisową wyników, a następnie przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka wykonano analizę zgodności rozkładów badanych cech empirycznych z rozkładem normalnym (Gaussa). Do wykazania istotności różnic wykorzystano test t-studenta, oraz testy nieparametrycznych U Manna-Whitneya. Do wykazania współzależności badanych cech użyto korelacji Spearmana. W poszukiwaniu niezależnych czynników wpływających na ocenę nasilenia ekspresji receptora TAS2R38 wykorzystano analizę regresji wielorakiej.

VII. Wyniki (rozdział 5): zostały przedstawione w postaci 40 tabel i 29 rycin oraz opatrzone komentarzem, który w sposób czytelny podsumowywał zaprezentowane dane.

Omówienie wyników przeprowadzonych badań wskazuje, że grupa chorych z PZZP bez polipów nosa i z polipami nosa różni się od siebie w dolegliwościach

zgłaszanych przez pacjentów. U chorych z PZZP z polipami nosa dominującym objawem są zaburzenia węchu, a u chorych z PZZP upośledzenie drożności nosa. Dodatkowo Autorka zaobserwowała istotnie statystycznie większe nasilenie zmian zapalnych w badaniu TK zatok u chorych z PZZP z polipami w porównaniu do chorych z PZZP. Co więcej, w grupach badanych stwierdziła znamienne większy poziom immunoglobuliny IgE w porównaniu do grupy kontrolnej. Pacjenci z polipami nosa wykazali statystycznie gorsze całościowe wyniki badania olfaktometrycznego oraz badania gustometrycznego. Obserwacje dotyczące poszczególnych elementów badania podmiotowego i przedmiotowego były zgodne z literaturą.

Wyniki badań genetycznych w populacji zbadanych pacjentów wykazały, że nie posiadali oni polimorfizmów w genie receptora węchu OR1G1. Niemniej jednak, przeprowadzona przez Doktorantkę analiza ekspresji genu na poziomie mRNA wykazała znamienne wzrost transkryptu receptora OR1G1 w tkankach pobranych z błony śluzowej chorych na PZZP w stosunku do osób z grupy kontrolnej.

Dodatkowo Autorka przeprowadziła eksperyment badawczy na linii komórkowej HeLa pozwalający na porównanie obrazu ekspresji receptora węchu w przewlekłym i ostrym stanie zapalnym. Linia komórkowa HeLa została potraktowana lipopolisacharydem (LPS), co stworzyło in vitro model ostrego stanu zapalnego. Ocena ekspresji genu OR1G1 w komórkach linii HeLa wykazała spadek ilości transkryptu genu OR1G1 po potraktowaniu LPS, co stanowiło przeciwieństwo stanu obserwowanego w PZZP. Na tej podstawie Doktorantka wysnuła ciekawą hipotezę, że ostry stan zapalny organizmu blokuje ekspresję receptora węchu i być może dzięki temu wpływa na przebieg procesu zapalnego.

Obserwacje lek. Karoliny Piskadło-Zborowskiej dotyczące polimorfizmów w obrębie genu receptora smaku gorzkiego TAS2R38 są nie tylko zgodne z literaturą, ale także prowadzą do nowych wniosków. Uzyskane rezultaty wykazały, że najczęściej stwierdzanym genotypem w populacji jest genotyp heterozygotyczny PAV/AVI obserwowany u 45% osób. Genotyp obronny PAV/PAV, który wg literatury może chronić przed rozwojem przewlekłych stanów zapalnych Doktorantka odnotowała najczęściej w grupie kontrolnej (u 31% pacjentów) i tylko u 17% osób z PZZP i 24% z PZZP z polipami nosa. Dodatkowo zaobserwowała znamiennej statystycznie korelację pomiędzy odczuwaniem smaku gorzkiego w badaniu gustometrycznym a genotypem chorych oraz pomiędzy wynikiem badania olfaktometrycznego a nasileniem ekspresji receptora TAS2R38.

Kolejna innowacyjna obserwacja wynikała z badań immunohistochemicznych ekspresji receptora TAS2R38 w pobranych tkankach, która wykazała na istotnie większą ekspresję receptora TAS2R38 u chorych z PZZP w stosunku do osób z grupy kontrolnej i dodatkowo migrację receptor TAS2R38 do jądra komórkowego. Kolejna analiza potwierdziła fakt, że u osób z genotypem niefunkcyjnym AVI/AVI średnia ekspresja receptora w badanych tkankach była większa.

VIII. Omówienie wyników (rozdział 6): Doktorantka w bardzo wyważony sposób podjęła dyskusję z autorami referencyjnych publikacji, co świadczy o dokładnym zgłębieniu zagadnienia i znajomości współczesnej literatury. Receptor węchu OR1G1 oraz receptor smaku gorzkiego TAS2R38, ze względu na lokalizację w górnych drogach oddechowych oraz pełnione tam funkcje, pretendują do miana czynników genetycznych odpowiedzialnych za powstawanie PZZP. Autorka wykazała, że pomimo braku polimorfizmów genu OR1G1 w populacji polskiej obecny jest wzrost poziomu transkryptu genu

OR1G1 u pacjentów chorych na PZZP w stosunku do pacjentów kontrolnych, co sugeruje udział receptorów OR1G1 w patogenezie PZZP. Kolejno wykazała związek zaburzeń zarówno w obrębie zmysłu węchu, jak i smaku z genotypem receptora TAS2R38 badanego. Polimorfizmy genotypu receptora smaku gorzkiego – TAS2R38 mogą przyczyniać się do indywidualnych różnic w predykcji do rozwoju PZZP. Do interesujących obserwacji należy zaliczyć także rezultat analizy immunohistochemicznej receptora TAS2R38, która wskazała na znamienne nadekspresję receptora u chorych z PZZP, co korelowało nie tylko z nasileniem zmian zapalnych, ale również z genotypem niefunkcyjnym AVI/AVI chorego. U tych chorych Doktorantka potwierdziła predyspozycje do rozwoju PZZP. Co więcej, z przeprowadzonych badań wynika, że receptory TAS2R38 u chorych z PZZP migrują do jądra, co prawdopodobnie może świadczyć o funkcji receptora w przekazywaniu sygnału bezpośrednio do jądra komórkowego. Jest to konkluzja dotychczas nie opisywana w literaturze.

IX. Wnioski (rozdział 7): odpowiadają uprzednio sformułowanym celom pracy i ściśle wynikają z uzyskanych wyników badań. Są ważne z klinicznego punktu widzenia, rzucają nowe spojrzenie na funkcję oraz lokalizację receptorów narządów zmysłów w komórce i ich wpływ na rozwój przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. W przyszłości mogą zostać wykorzystane w terapii celowanej w PZZP. Niemniej, w mojej ocenie, byłoby bardziej korzystne dla całej pracy, przedstawienie ich nie w formie uzyskanych wyników tylko w formie komentarza do tych wyników. Ponadto we wnioskach Autorka wyraźnie podkreśla, że badania dotyczą populacji polskiej. Sugeruje to, że Autorka spodziewa się odmiennych wyników w innych populacjach. Niestety nic na ten temat nie zostało powiedziane ani we wstępie, ani w celach pracy, ani w dyskusji.

Rozprawę kończy zestawienie 106 pozycji piśmiennictwa zarówno polskiego, jak i anglojęzycznego, w tym 20 publikacji z lat 2016-2020. Pozycje piśmiennictwa są prawidłowo dobrane i właściwie cytowane.

Praca jest napisana poprawnym językiem. Zagadnienia poddawane analizie świadczą o bardzo dobrej znajomości przez Autorkę omawianego tematu.

Praca stanowi wyczerpujące, staranne i oryginalne opracowanie problemu naukowego, znacząco przyczyniła się do zaktualizowania wiedzy dotyczącej wpływu receptorów smaku gorzkiego i węchu na predykcję do rozwoju przewlekłego zapalenia zatok. Zarówno treść, jak i sam schemat zaplanowanych badań dowodzą dużej umiejętności Autorki do samodzielnego przeprowadzania badań naukowych.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Karoliny Piskadło-Zborowskiej z Oddziału Otorynolaryngologii Międzyleskiego Szpitala Specjalistycznego w Warszawie, napisana pod kierunkiem merytorycznym dr hab. n. med. prof. CMKP Karoliny Dżaman (promotor) i dr n. med. Elizy Brożek – Mądry (promotor pomocniczy) **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.).**

Przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Kliniki Otorynolaryngologii
Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego
prof. dr. hab. n. med. Antoni Krzeski