

AUTOREFERAT

dr n. med. Patrycja Nejman-Gryz

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 2021

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Patrycja Nejman-Gryz

Zajmowane stanowisko i adres: adiunkt w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa, Polska

tel. + 48 22 599 25 62

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

VII.2000 – dyplom magistra biologii, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii

III.2005 – stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, nadany uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ inhibitora fosfodiesterazy IV na przebieg doświadczalnej astmy atopowej – badania na modelu świnki morskiej”.

Promotor w przewodzie doktorskim: dr hab. Hanna Grubek-Jaworska

Recenzenci: prof. dr hab. Barbara Machnicka-Rowińska

prof. dr hab. Jan Kuś

X.2005 – uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego, nr prawa: PWZDL 11800

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

VIII.2004-IX.2011 – starszy asystent w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa, Banacha 1a

X.2011 – obecnie – adiunkt w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Banacha 1a

4. Dane bibliometryczne:

Dorobek naukowy (jako pierwszy autor i współautor) na dzień wykonania dołączonej do autoreferatu analizy bibliometrycznej (09.06.2021):

- 41 oryginalne, pełnotekstowe prace naukowe, w tym 30 w czasopismach z IF (28 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora); z czego 8 jako pierwszy/korespondujący autor
- 4 rozdziały książek/podręczników (wszystkie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 34 doniesienia na zjazdach międzynarodowych (streszczenia prezentowane w formie plakatu i prezentacji ustnej)

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wg listy Journal Citation Reports JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **76,507** (z czego 5,605 z pełnotekstowych prac oryginalnych w suplementach czasopism)

Sumaryczna punktacja MEiN (dawniej MNiSW) wszystkich publikacji: **1521**

Liczba cytowań (wg bazy Web of Science) z dnia 09.06.2021, bez autocytowań: **237**

Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science) z dnia 09.06.2021: **9**

	Dorobek naukowy			
	Przed doktoratem		Po doktoracie	
	IF	MEiN	IF	MEiN
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	2,617	35	68,285	1486
Opisy przypadków	-	-	-	-
Razem	2,617	35	68,285	1486
Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism	-	-	5,605	-
Listy do redakcji czasopism	-	-	-	-
Razem	2,617	35	73,89	1486

4.1 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Udział aktywnych biologicznie substancji pochodzenia nabłonkowego w patofizjologii zapalenia dróg oddechowych u chorych z obturacyjnymi chorobami układu oddechowego

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Cykl 7 oryginalnych publikacji pełnotekstowych:

1. **Nejman-Gryz P**, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Grabczak M, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. The expression of IL17RA on sputum macrophages in asthma patients. *Cytokine*. 2021;143:155518.

IF 2,952, MEiN 100

Wkład: autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w

części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

2. **Nejman-Gryz P**, Górska K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Periostin and Thymic Stromal Lymphopoietin—Potential Crosstalk in Obstructive Airway Diseases. *J Clin Med.* 2020;9(11):3667

IF 3,303, MEiN 140

Wkład: autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

3. **Nejman-Gryz P**, Górska K, Krenke K, Peradzyńska J, Paplińska-Goryca M, Kulus M, Krenke R. Periostin concentration in exhaled breath condensate in children with mild asthma. *J Asthma.* 2019;58(1):60-68.

IF 1,899, MEiN 70

Wkład: autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

4. Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Proboszcz M, Kwiecień I, Hermanowicz-Salamon J, Grabczak E, Krenke R. Expression of TSLP and IL-33 receptors on sputum macrophages of asthma patients and healthy subjects. *J Asthma.* 2020;57(1):1-10.

IF 1,899, MEiN 70

Wkład: autorka uczestniczyła w opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

5. Górska K, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Comparison of Thymic Stromal Lymphopoietin Concentration in Various Human Biospecimens from Asthma and COPD Patients Measured with Two Different ELISA Kits. *Adv Exp Med Biol.* 2017;955:19-27

IF 1,76 MEiN 25

Wkład: autorka uczestniczyła w opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu danych literaturowych, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

- Górska K, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Paplińska-Goryca M, Korczyński P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative Study of IL-33 and IL-6 Levels in Different Respiratory Samples in Mild-to-Moderate Asthma and COPD. *COPD*. 2018;15(1):36-45.

IF 2,503, MEiN 30

Wkład: autorka uczestniczyła w opracowaniu pomysłu badania, gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

- Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, Proboszcz M, **Nejman-Gryz P**, Górska K, Krenke R. The Expressions of TSLP, IL-33, and IL-17A in Monocyte Derived Dendritic Cells from Asthma and COPD Patients are Related to Epithelial-Macrophage Interactions. *Cells*. 2020;9(9):1944

IF 4,366, MEiN 140

Wkład: autorka uczestniczyła w gromadzeniu materiałów, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Sumaryczny wynik punktacji IF i MEiN publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

Łączny IF 18,409

Łączny IF, jako pierwszy lub korespondencyjny autor 14,043

Łączna punktacja MEiN 520+ 25+30

- c) omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przedstawiony cykl badań dotyczy roli cytokin produkowanych przez komórki nabłonka dróg oddechowych w patofizjologii obturacyjnych chorób układu oddechowego. Przeprowadzone badania pozostają w ścisłym związku z moimi obecnymi i wcześniejszymi zainteresowaniami naukowymi koncentrującymi się wokół immunologicznego podłoża mechanizmów odgrywających rolę w patogenezie astmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP).

Cytokiny pochodzenia nabłonkowego (TSLP, IL-25 i IL-33) pełnią bardzo ważne funkcje w chorobach o podłożu alergicznym. Od kilku lat szeroko badana jest ich rola w patofizjologii m.in. astmy, atopowego zapalenia skóry czy przewlekłego zapalenia zatok, a ostatnie doniesienia sugerują ich udział w etiopatogenezie marszu alergicznego. Cytokiny te zbiorczo nazywane alarminami nabłonkowymi są uwalniane z uszkodzonych i/lub poddanych stresowi komórek, w celu przekazania sygnału do układu odpornościowegoo uszkodzeniu nabłonka. Wykazano, że cząsteczki te wraz z komórkami, na które oddziałują pełnią ważne funkcje nie tylko w inicjowaniu odpowiedzi alergicznej, ale także w efektorowej fazie zapalenia, głównie poprzez aktywację odpowiedzi immunologicznej typu Th2. Innym białkiem produkowanym przez komórki nabłonka jest periostina, nienależąca do triady alarmin, ale również zaangażowana w reakcje immunologiczne typu 2 i będąca markerem

zapalenia eozynofilowego. Interakcje i zależności między komórkami układu immunologicznego, komórkami nabłonka oddechowego i cytokinami produkowanymi w procesie zapalenia w atopowych i nieatopowych obturacyjnych chorobach układu oddechowego są słabo poznane i znajdują się w strefie zainteresowania wielu badaczy, zwłaszcza w kontekście rozwoju nowoczesnych terapii ukierunkowanych na odpowiedź immunologiczną typu 2. W przypadku chorób obturacyjnych układu oddechowego wiedza dotycząca udziału białek pochodzenia nabłonkowego w patofizjologii tych chorób jest stale poszerzana i wciąż poszukuje się związków, które mogłyby stać się nowym celem terapeutycznym. Zastosowanie innowacyjnych metod leczenia biologicznego wymaga wyselekcjonowania grupy pacjentów, którzy potencjalnie mogą osiągnąć największe korzyści z ukierunkowanego leczenia. W świetle ostatnich publikacji naukowych, które kładą nacisk na indywidualizację rozpoznawania i leczenia chorób obturacyjnych układu oddechowego, ważne jest poznanie podłoża reakcji immunologicznych leżących u podstaw astmy i POChP.

Astma i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) to najczęstsze przewlekłe choroby układu oddechowego w naszym społeczeństwie. Charakteryzują się przewlekłym zapaleniem i uszkodzeniem dróg oddechowych prowadzącym do obturacji oskrzeli (cechującej się upośledzeniem przepływu powietrza) na ogół odwracalnej w astmie, ale nieodwracalnej i postępującej w POChP. Do głównych objawów astmy i POChP należą duszność, świsły słychalny podczas oddychania, kaszel i pogorszenie tolerancji wysiłku. Ujawnienie się choroby zależy zarówno od predyspozycji osobniczych (genetycznych) jak również od czynników środowiskowych, takich, jak alergeny, które sprzyjają rozwojowi astmy oraz dym tytoniowy, który stanowi najważniejszą przyczynę POChP. Zarówno astma, jak i POChP są chorobami bardzo złożonymi i cechującymi się zmiennym przebiegiem. Jednym z najważniejszych zjawisk odgrywających rolę w rozwoju i przebiegu tych chorób jest napływ do dróg oddechowych różnych komórek zapalnych. Obecność i aktywność określonych grup komórek w drogach oddechowych jest ściśle związana z powstawaniem objawów choroby. Komórkami typowymi dla astmy są granulocyty kwasochłonne (eozynofile), a w POChP dominującą rolę odgrywają granulocyty obojętnochłonne (neutrofile). Wysoki poziom ekspresji produkowanych mediatorów zapalenia przyczynia się do zmian strukturalnych zwanych remodelingiem (przebudową) dróg oddechowych. W patofizjologii chorób obturacyjnych istotną rolę pełnią interakcje pomiędzy napływającymi komórkami zapalnymi, komórkami nabłonka dróg oddechowych oraz produkowanymi w efekcie mediatorami stanu zapalnego. Wiedza dotycząca tego zagadnienia rozwija się dynamicznie na przestrzeni ostatnich lat. Chociaż charakter zapalenia nie jest taki sam w obu chorobach, wiele cytokin i chemokin wydzielanych przez komórki nabłonka dróg oddechowych jest tożsamy.

Astma dotyczy ponad 300 mln ludzi na świecie i w związku ze stałym wzrostem zachorowań stanowi poważny problem zdrowia publicznego, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych. Choroba ta charakteryzuje się stanem zapalnym dróg oddechowych, na który składają się: naciek komórek zapalnych, ich aktywacja, uwalnianie szeregu mediatorów (m.in. cytokin, chemokin, fibronektyny, czynników wzrostu), przerost mięśni gładkich ściany oskrzeli i włóknienie. Procesy te prowadzą do trwałych zmian strukturalnych, pogrubienia błony podstawnej, hiperplazji mięśni gładkich i w konsekwencji, do zwężenia światła dróg oddechowych, które u części chorych może mieć nawet charakter nieodwracalny. Astma jest złożoną chorobą, która charakteryzuje się dużą różnorodnością objawów klinicznych i mechanizmów, które za nie odpowiadają. Ze względu na niejednorodny charakter choroby można wyróżnić typy astmy związane z: podłożem alergicznym, wiekiem zachorowania, chorobami współistniejącymi (otyłość, wrażliwość na aspirynę, polipy nosa). Chociaż astma jest chorobą nieuleczalną, jednak przy zastosowaniu odpowiedniego leczenia i stosowaniu się do zaleceń można ją kontrolować w sposób praktycznie całkowity. Analiza heterogenności astmy przyczyniła się do lepszego zrozumienia patogenezy choroby i opracowania nowych strategii terapeutycznych, zwłaszcza w przypadku astmy ciężkiej. Najpowszechniej spotykanym rodzajem jest

astma alergiczna (atopowa), zwana również astmą typu Th2, stanowiąca ponad 50% przypadków u dorosłych. W tym typie astmy wiodącą rolę pełnią limfocyty Th2 wydzielające szereg interleukin (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) aktywujących i rekrutujących eozynofile, jak również pośrednio wytwarzanie przeciwciał IgE. W astmie nieatopowej wskazuje się na znaczny udział neutrofilów, limfocytów Th1 i makrofagów. Podłoże i mechanizmy zapalenia nie eozynofilowego w astmie nie są do końca poznane. Ponieważ właśnie neutrofile wydają się odgrywać znamienne rolę w zapaleniu nie eozynofilowym, na nich skupia się większość prac związanych z tym tematem. Większość doniesień nie potwierdza jednak udziału granulocytów obojętnochłonnych w procesie zapalnym w łagodnej, stabilnej astmie, natomiast są dowody na ich rolę w ciężkiej postaci tej choroby i w ciężkich zaostrzeniach.

POChP zajmuje obecnie 3 miejsce wśród przyczyn zgonów na świecie. Choroba wyróżnia się postępującą i nieodwracalną obturacją dróg oddechowych, która jest wynikiem choroby małych dróg oddechowych i zmian destrukcyjnych składających się na rozedmę płuc. U dużej części chorych prowadzi ostatecznie do niewydolności oddechowej. POChP jest powodowana głównie ekspozycją układu oddechowego na szkodliwe pyły i gazy, w tym dym tytoniowy zawierający wiele szkodliwych substancji wywołujących reakcję zapalną i nadmierny stres oksydacyjny w płucach. W POChP podobnie jak w astmie obecny jest przewlekły, nadmierny stan zapalny, a dominującymi komórkami napływowymi są neutrofile i makrofagi, które wraz z komórkami nabłonka wydzielają mediatory zapalenia. W patogenezie POChP istotną rolę odgrywa dysfunkcja śródbłonka, której konsekwencją są zaburzenia syntezy i uwalniania mediatorów zapalnych. Zmiany te powodują, że proces zapalny jest wykrywany również w krążeniu systemowym, gdzie stwierdza się wyższą liczbę leukocytów, podwyższone stężenia fibrynogenu, CRP i cytokin prozapalnych m.in. TNF α , IL-1 β , IL-6 i IL-8. W przebiegu POChP dochodzi do rozwoju rozedmy płuc, a w zjawisku tym istotną rolę odgrywają makrofagi przyczyniające się do produkcji elastaz (MMP-9, MMP-12) oraz katepsyn. Dodatkowo uszkodzenie błony śluzowej oskrzeli zaburza pracę znajdujących się w niej gruczołów powodując nadmierną produkcję i zaleganie wydzieliny. Podobnie jak w przypadku astmy wśród chorych na POChP spotykamy różne fenotypy choroby, a mechanizmy różnic fenotypowych nie są do końca zdefiniowane.

Nabłonek dróg oddechowych stanowi funkcjonalną barierę dla patogenów, alergenów i substancji drażniących, chroniąc organizm przed niekorzystnym wpływem środowiska zewnętrznego. Funkcja bariery może być pełniona dzięki zwartym połączeniom przylegających do siebie komórek, procesowi śluzowo-rzęskowego oczyszczania oraz wydzielaniu substancji przeciwdrobnoustrojowych. Oprócz funkcji ochronnej nabłonek będąc źródłem cytokin i mediatorów pełni kluczowe funkcje w modulacji odpowiedzi immunologicznej i integracji wszystkich mechanizmów obronnych płuc. Zakłócenie jednej bądź kilku funkcji nabłonka powoduje dysfunkcję bariery nabłonkowej, co zwiększa podatność na infekcje, a długotrwałe toczący się proces zapalny przyczynia się do przewlekłych chorób układu oddechowego m.in. astmy i POChP.

Oprócz bariery fizycznej i mechanicznego usuwania wdychanych patogenów i alergenów poprzez proces oczyszczania śluzowo-rzęskowego, nabłonek oddechowy pełni bardzo ważne funkcje w układzie immunologicznym. Jest bogatym źródłem cytokin, chemokin, czynników wzrostu, peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz w rekrutacji leukocytów, co pozwala lepiej zrozumieć, w jaki sposób różne bodźce (alergeny, zanieczyszczenia, patogeny) mogą napędzać charakterystyczną odpowiedź immunologiczną poprzez ich interakcje z nabłonkiem. Komórki nabłonka wraz z leukocytami potrafią szybko reagować na zagrożenia dzięki posiadanym na powierzchni receptorom PRR (*Pathogen Recognition Receptors*) rozpoznającym fragmenty struktury patogenów PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) lub wzorce molekularne związane z uszkodzeniem komórki – DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*). Nabłonek dróg oddechowych bierze udział nie tylko we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, ale także w odpowiedzi nabytej, której

klasycznym przykładem jest odpowiedź typu 2, w której uczestniczą udział eozynofile, bazofile, mastocyty, makrofagi, limfocyty T pomocnicze CD4+ oraz komórki ILC2 (*innate lymphoid cells*). Na komórkach nabłonka dróg oddechowych znajdują się receptory biorące udział w rozpoznawaniu komórek i mediatorów inicjujących odpowiedź immunologiczną, a dodatkowo nabłonek sam uwalnia cytokiny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej i inne cząsteczki odgrywające kluczową rolę w procesie zapalenia. Przykładem mediatorów pochodzenia nabłonkowego ukierunkowujących odpowiedź immunologiczną w kierunku Th2 są cytokiny: TSLP, IL-25 i IL-33, białko macierzy-periostina oraz cząsteczki DAMPs.

IL-25, IL-33, TSLP oraz periostina pobudzają i stymulują dojrzewanie komórek dendrytycznych (*dendritic cell DC*) oraz zwiększają rekrutację komórek efektorowych Th2. Dane pochodzące z eksperymentów na mysich modelach dostarczają przekonujących dowodów na udział cytokin nabłonkowych w odpowiedzi immunologicznej zarówno adaptacyjnej, jak i wrodzonej w procesie przebudowy dróg oddechowych, a także w inicjowaniu odpowiedzi typu 2. Wiadomo, że cytokiny te ulegają ekspresji w tkance płucnej i komórkach układu odpornościowego u ludzi, jednak ich udział w odpowiedzi alergicznej w płucach jest mniej wyraźny niż w mysich modelach choroby. Mechanizmy, za pomocą których komórki nabłonka wytwarzają cytokiny w odpowiedzi na różne bodźce oraz rola tych cytokin u pacjentów z chorobami obturacyjnymi układu oddechowego nie została jednoznacznie określona i pozostaje przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Rola TSLP, IL-33 oraz IL-25 jest szeroko badana w astmie, jako chorobie mającej często podłoże alergiczne. Znaczenie i funkcja tych cytokin w POChP nie jest znana. Z doświadczeń *in vitro* i na modelach zwierzęcych wiadomo, że atopia, czyli genetycznie uwarunkowany zespół zaburzeń układu odpornościowego wynikający z reakcji organizmu na dany alergen, przebiega z udziałem TSLP, IL-33 oraz IL-25.

TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*) – limfopoetyna zrębu grasicy pobudza odpowiedź Th2 zależną poprzez wpływ na dojrzewanie komórek prezentujących antygen, wzmaga ekspresję IL-4, IL-5 i IL-13 oraz napływ eozynofili. TSLP jest produkowana głównie przez komórki nabłonka w płucach i skórze, a jej podwyższone stężenia były opisane w materiałach biopsyjnych z dróg oddechowych astmatyków. Do produkcji i uwalniania TSLP dochodzi na skutek uszkodzeń mechanicznych, działania cytokin prozapalnych (TNF α , IL-4, IL-5) czy proteaz. Receptor dla TSLP jest obecny m.in. na komórkach dendrytycznych, limfocytach, mastocytach, komórkach mięśni gładkich czy komórkach nabłonka w drogach oddechowych. TSLP pobudza komórki dendrytyczne do produkcji IL-8 i eotaksyny 2, które z kolei ukierunkowują natywne limfocyty T do różnicowania w stronę Th2. TSLP wpływa także bezpośrednio na komórki NK indukując produkcję IL-4 i IL-13. W badaniach *in vitro* dowiedziono, że stymulacja eozynofili TSLP wpływa na ich degranulację, co potwierdza udział eozynofili w odpowiedzi alergicznej wywołanej przez TSLP. Wiadomo, że w mysim modelu astmy transgeniczna ekspresja TSLP jest wystarczająca do wywołania cech astmy, w tym zapalenia w drogach oddechowych, napływu eozynofili i wywołania nadreaktywności. TSLP jest związana z obturacją dróg oddechowych, a jej stężenie koreluje ze stopniem ciężkości choroby i opornością na glikokortykosteroidy.

Interleukina 33 (IL-33) należąca do rodziny cytokin IL-1 funkcjonuje, jako alarmina, cytokina pro alergiczna a także czynnik transkrypcyjny. Cytokina ta charakteryzuje się silnymi właściwościami immunomodulującymi, podobnie jak IL-1 β oraz IL-18. IL-33 ulega ciągłej niskiej ekspresji w warunkach homeostazy i jest nadprodukowana w trakcie procesu zapalnego. W związku z tym, że IL-33 jest bardzo aktywną cytokiną konstytutywnie wyrażaną w zdrowych tkankach, niezwykle ważna jest regulacja jej aktywności. Proteazy zapalne mogą zarówno zwiększać bioaktywność IL-33, jak też ją znosić. IL-33 jest wytwarzana przez komórki nabłonka, fibroblasty,

komórki mięśni gładkich, a sama indukuje produkcję TSLP przez komórki nabłonka. Dokładne mechanizmy uwalniania IL-33 *in vivo* nie są jeszcze poznane, lecz z pewnością uszkodzenie komórek lub tkanek jest głównym czynnikiem w tym procesie. Uwolniona do przestrzeni pozakomórkowej IL-33 może zostać „wyłapana” przez rozpuszczalny receptor ST2, obecny m.in. na komórkach tucznych i limfocytach Th2. Wysoki poziom ST2 stwierdza się w wielu chorobach, takich jak: astma, idiopatyczne zwłóknienie płuc, reumatoidalne zapalenie stawów czy toczeń układowy. Badania na ludziach i modelach mysich wskazują na centralną rolę IL-33 w mediowaniu zapalenia typu Th2 zarówno we wrodzonej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej, poprzez współdziałanie z komórkami typu ILC2 w produkcji IL-5 i IL-13. IL-33 wpływa na ekspresję cytokin promujących proliferację, angiogenezę, migrację, przebudowę macierzy, hamowanie apoptozy oraz rekrutację poszczególnych komórek układu odpornościowego. Ekspresja IL-33 jest podwyższona w drogach oddechowych pacjentów z ciężką astmą.

Interleukina 25 (IL-25) znana także, jako IL-17E należy do rodziny cytokin IL-17 i produkowana jest głównie przez komórki nabłonka, ale także przez limfocyty Th2, mastocyty i eozynofile. IL-25, jako jedyna z rodziny IL-17 może napędzać eozynofilię i zwiększać produkcję cytokin Th2. IL-25 wiąże się do receptora złożonego z 2 podjednostek (IL17RA i IL17RB) obecnego m.in. na komórkach prezentujących antygen, komórkach nabłonka dróg oddechowych, fibroblastach, makrofagach i komórkach mięśni gładkich. IL-25 wpływa na rozwój i aktywację komórek ILC2, a w konsekwencji do wydzielania IL-5 i IL-13. Wykazano, że ekspresja IL-25 i jej receptora jest podwyższona u pacjentów z astmą typu Th2. Opisano, że chorzy na astmę mający wysokie stężenia IL-25 charakteryzują się zazwyczaj: atopią, eozynofilią, podwyższonym stężeniem cytokin typu Th2 i zwiększoną nadreaktywnością oskrzeli. Na modelu mysim dowiedziono, że dootrzewnowe podanie IL-25 powoduje napływ eozynofiliów, produkcję śluzu oraz hiperplazję komórek nabłonkowych w płucach indukowane IL-5 i IL-13. IL-25 uczestniczy także w procesie remodelingu wpływając na proliferację komórek śródbłonka i stymulację miejscowej angiogenezy w błonie śluzowej oskrzeli.

Periostina, jest markerem zapalenia w chorobach obturacyjnych. Uczestniczy w procesie zapalenia na tle alergicznym w chorobach przewlekłych, bierze także udział w przebudowie tkanek poprzez wpływ na fibroblasty, komórki nabłonka, eozynofile i inne komórki układu immunologicznego. Jako białko macierzy wiąże się do receptorów komórkowych (np. integryn), aktywując ścieżki sygnałowe i ułatwiając migrację i adhezję komórek. Periostina jest wytwarzana głównie przez fibroblasty, ale także przez komórki nabłonka i śródbłonka dróg oddechowych w odpowiedzi na stymulację IL-4 i IL-13. Opisano, że w chorobach obturacyjnych stężenia periostiny w surowicy korelują dodatnio z poziomem FeNO, liczbą eozynofiliów we krwi oraz mianem IgE, a gen dla periostiny ulega podwyższonej ekspresji u pacjentów z astmą typu Th2. Ponieważ periostina odgrywa ważną rolę w patogenezie chorób alergicznych, stanowi obiecujący cel molekularny dla opracowania środków terapeutycznych przeciwko tym chorobom.

Celem prac stanowiących cykl publikacji składających się na osiągnięcie naukowe była ocena roli, jaką pełnią cytokiny produkowane przez nabłonek dróg oddechowych w patofizjologii astmy i POChP, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji tych białek z komórkami napływowymi, głównie makrofagami oraz komórkami nabłonka dróg oddechowych.

Poniżej przedstawiono główne wnioski z cyklu publikacji. W dalszej części każdą z publikacji omówiono bardziej szczegółowo.

GLÓWNE WNIOSKI Z CYKLU PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE

- Ekspresja IL-33 w surowicy, płwocinie indukowanej, kondensacie powietrza wydychanego oraz wycinkach tkankowych z oskrzeli osiągnęła podobny poziom u chorych na astmę i POChP, co może sugerować, że aktywacja IL-33 przebiega w podobny sposób w obu chorobach obturacyjnych.
- Periostina i TSLP wykazują związek z zapaleniem eozynofilowym w drogach oddechowych i wydają się być ważnymi składnikami patofizjologii astmy atopowej, w przypadku POChP udział tych markerów jest dużo mniejszy i nieporównywalny do astmy.
- Periostina i TSLP współdziałają w zapaleniu na poziomie lokalnym w astmie, a związek pomiędzy tymi biomarkerami, a eozynofilią i odpowiedzią typu Th2 wskazują, że oś periostina-TSLP może stanowić potencjalny cel terapeutyczny.
- Stężenie periostiny w kondensacie powietrza wydychanego, chociaż osiąga wymieralne wartości, nie może być traktowany, jako biomarker zapalenia w astmie u dzieci z łagodną/umiarkowaną postacią choroby.
- Makrofagi dróg oddechowych typu M2(CD206+) wykazują podwyższoną ekspresję receptorów dla TSLP i IL-33, natomiast makrofagi typu M1(CD206-) charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptorów tylko dla TSLP. Wskazuje to na istotną rolę współdziałania makrofagów, TSLP i IL-33 w procesie zapalenia toczącym się w przebiegu astmy.
- Podwyższona ekspresja receptora IL17RA na makrofagach CD206+ wraz ze zwiększonymi stężeniami IL-25 i eozynofilią w płwocinie akcentują związek pomiędzy makrofagami i IL-25 w przebiegu reakcji alergicznej w astmie.
- Komórki dendrytyczne mogą być potencjalnym źródłem TSLP i IL-33 w drogach oddechowych. TSLP, IL-33 i IL-17A uczestniczą w interakcjach pomiędzy komórkami dendrytycznymi, komórkami nabłonka i komórkami zapalnymi naciekającymi drogi oddechowe w obturacyjnych chorobach płuc.

PUBLIKACJA NR 1

Nejman-Gryz P, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Grabczak M, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. The expression of IL17RA on sputum macrophages in asthma patients. *Cytokine*. 2021;143:155518.

Cytokiny z rodziny interleukiny 17 są ważnymi regulatorami odpowiedzi zapalnej w chorobach zakaźnych i zapalnych. Członkowie tej rodziny (zwłaszcza IL-25 i IL-17A) odgrywają ważną rolę w rozwoju astmy i alergii. Podczas gdy IL-17A inicjuje stan zapalny poprzez udział w rekrutacji neutrofilów do miejsca zapalenia, IL-25 wiąże się z odpowiedzią immunologiczną typu 2. Receptory dla obu tych cytokin są heterodimerami i składają się z dwóch podjednostek: IL17RA/ RB dla IL-25 i IL17RA/RC dla IL-17A, gdzie podjednostka IL17RA jest identyczna w obu receptorach. Receptor dla IL-25 (IL17RA/RB) ulega stałej ekspresji na fibroblastach i komórkach nabłonka w płucach oraz na makrofagach płucnych. Dowiedziono, że ekspresja IL-25 i jej receptora jest podwyższona w błonie śluzowej oskrzeli osób chorych na astmę, a także w komórkach skóry właściwej osób z atopią. Rola IL-25 została dobrze zbadana i opisana na zwierzęcych modelach chorób alergicznych oraz w badaniach *in vitro*, ekspresja receptora dla IL-25 na komórkach układu immunologicznego podczas odpowiedzi alergicznej w przebiegu astmy u ludzi nie jest poznana i dobrze udokumentowana.

Makrofagi stanowią najliczniejszą populację komórek napływowych w płucach, gdzie odgrywają kluczową rolę w rozwoju chorób na tle alergicznym. Z uwagi na różnorodność, często przeciwstawne funkcje makrofagi dzieli się na spolaryzowane klasycznie prozapalne M1 i spolaryzowane alternatywnie M2. Makrofagi M1 powstające w środowisku prozapalnym pod wpływem lipopolisacharydu oraz cytokin prozapalnych takich jak: TNF- α i IFN- γ , uczestniczą w

inicjacji i rozwoju reakcji zapalnej. Makrofagi M2 uczestniczą w wyciszaniu reakcji zapalnej i promują gojenie ran, a polaryzacja makrofagów w kierunku M2 jest indukowana przez IL-4 i IL-13 oraz inne cytokiny Th2. Polaryzacja makrofagów w kierunku prozapalnego fenotypu M1 lub proastmatycznego fenotypu M2 jest procesem zachodzącym stale pod wpływem mikrośrodowiska, zgodnie z bodźcem aktywacyjnym. Duża część makrofagów pęcherzykowych może jednocześnie cechować się wysoką ekspresją markerów M1 i M2, co może ułatwić przełączanie między funkcjami związanymi z M1 lub M2, umożliwiając tym samym odpowiednią reakcję na bodźce i środowisko tkankowe. Makrofagi spolaryzowane w kierunku M2 charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptora CD206 (receptor dla mannozy) i produkują chemokiny, takie jak CCL17, CCL22 i CCL24. Wykazano, że w drogach oddechowych astmatyków makrofagi typu M2 występują dużo liczniej niż u osób zdrowych, a ich liczba jest wprost proporcjonalna do ciężkości choroby. Wiedza dotycząca udziału makrofagów typu M2 w przebiegu reakcji alergicznej jest stale uzupełniana i poszerzana i znajduje się w kręgu zainteresowania wielu badaczy.

Celem naszych doświadczeń było określenie ekspresji podjednostki IL17RA (wspólnej części receptora dla IL-25 i IL-17A) na makrofagach typu M2 (CD206+) u pacjentów z astmą w stosunku do zdrowych osób. Do badania włączono 34 dorosłych astmatyków w stabilnym okresie choroby oraz 34 dorosłych, zdrowych ochotników. U wszystkich uczestników przeprowadzono indukcję płwociny (*induced sputum* IS) i wykonano preparaty cytologiczne, dodatkowo w supernatantach płwocin oznaczono immunoenzymatycznie stężenia IL-25 oraz IL-17A. W preparatach cytologicznych oceniono mikroskopowo udział poszczególnych typów komórek napływowych (makrofagów, neutrofilów, eozynofilów i limfocytów) i wykonano barwienie immunofluorescencyjne poszukując ekspresji receptorów dla IL17RA i CD206.

Nasze wyniki wykazały istotną statystycznie podwyższoną ekspresję receptora IL17RA na makrofagach typu M2 z płwociny indukowanej osób chorych na astmę w stosunku do osób zdrowych. Dodatkowo procent makrofagów z równoczesną ekspresją CD206 i IL17RA był znacznie wyższy w grupie astmatyków i korelował dodatnio ze stężeniem całkowitego IgE. W grupie osób zdrowych najliczniejszą populacją makrofagów były komórki CD206+ bez ekspresji IL17RA. Astmatycy charakteryzowali się podniesionymi stężeniami IL-25 i IL-13 w płwocinie, natomiast poziom IL-17A nie różnił się pomiędzy badanymi grupami.

Wykonaliśmy także dodatkowe analizy dzieląc grupy badane pod kątem atopii oraz przyjmowanego leczenia. Okazało się, że grupa chorych na astmę z atopią charakteryzowała się podwyższoną liczbą makrofagów typu M2 z ekspresją receptora IL17RA i znacznie wyższymi stężeniami IL-25, podczas gdy grupa zdrowych ochotników z atopią wyróżniała zwiększoną liczbą makrofagów M2, ale bez jednoczesnej ekspresji IL17RA. Analiza w grupie astmatyków pod kątem przyjmowanego leczenia wykazała, że leczenie steroidami bądź preparatami anty IgE nie wpływało na stężenia IL-25 czy IL-13 w płwocinie, jedynym parametrem różnicującym grupy był poziom IL-17A, podwyższony w grupie leczonej omalizumabem.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunęliśmy wniosek, że u chorych na astmę makrofagi typu M2 wykazujące ekspresję CD206+ są komórkami efektorowymi dla receptora IL17RA, będącego wspólną podjednostką receptorów dla IL-25 i IL-17A. Przypuszczamy, że może to być związane ze środowiskiem Th2 zależnym oraz z podwyższonym stężeniem IL-13 i IL-25, a także obecnością eozynofilów w drogach oddechowych osób chorych na astmę. Nasze wyniki były najprawdopodobniej pierwszymi dostarczającymi danych na temat interakcji pomiędzy makrofagami CD206+ a IL-25, działającą poprzez eksprymowaną podjednostkę receptora IL17RA.

Nejman-Gryz P, Górská K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Periostin and Thymic Stromal Lymphopoietin—Potential Crosstalk in Obstructive Airway Diseases. *J Clin Med.* 2020;15;9(11):3667.

Periostina i limfopoetyna zrębu grasicy (TSLP) są nowo opisywanymi markerami obturacyjnych chorób układu oddechowego, a ich rola jest poznawana coraz dogłębniej. Periostina uczestniczy w wielu procesach biologicznych m.in. proliferacji komórek, rozwoju tkanek, procesach naprawczych i przebudowie tkanek. Jej udział w przebiegu astmy jest szeroko badany i wiadomo, że bierze udział w regulacji procesu włóknienia i produkcji śluzu. TSLP odgrywa ważną rolę w odpowiedzi dróg oddechowych na alergeny u pacjentów z astmą alergiczną, a także w utrzymywaniu eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych u tych osób. Pomimo gromadzonej wiedzy na temat udziału tych markerów w patofizjologii chorób obturacyjnych nadal istnieje szereg pytań dotyczących funkcjonowania tych markerów w płucach.

Związek pomiędzy periostiną a TSLP w przypadku atopii i odpowiedzi typu Th2 był opisywany u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Na modelu mysim zaobserwowano, że periostina przyczynia się do proliferacji keratynocytów w skórze i bezpośrednio do wytwarzania TSLP. Inni autorzy dowiedli, że periostina razem z TSLP odgrywa bardzo ważną rolę w tworzeniu środowiska Th2 w trakcie rozwoju chłoniaka skórny T komórkowego (CTCL), a stężenia obu markerów korelują dodatnio z poziomem IL-4. Kolejna grupa autorów opisała podwyższone stężenia periostiny w błonie śluzowej jamy ustnej i surowicy pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej (OLP), co wiązało się z odpowiedzią typu Th2 i jednoczesnym podwyższonym stężeniem TSLP.

Biorąc pod uwagę powyższe dane podjęliśmy próbę określenia potencjalnego związku pomiędzy periostiną a TSLP w przebiegu odpowiedzi typu Th2 w obturacyjnych chorobach płuc. Szczegółowymi celami pracy było: określenie stężeń periostiny, TSLP w surowicy krwi oraz płwocinie indukowanej pacjentów z astmą, POChP oraz osób zdrowych; oznaczenie ekspresji obu markerów na poziomie mRNA w osadzie z płwociny indukowanej; poszukiwanie potencjalnych korelacji pomiędzy periostiną, TSLP a innymi markerami odpowiedzi typu Th2 (IL-4, IL-13, eozynofilami).

Pacjenci z astmą charakteryzowali się wysokimi stężeniami całkowitego IgE i eozynofilią zarówno we krwi, jak i w płwocinie, natomiast chorzy na POChP wyróżniali się neutrofilią w płwocinie oraz najgorszymi wśród badanych grup parametrami testów oddechowych. Stężenia wszystkich badanych cytokin były wyższe w surowicy niż w płwocinie. Pomiędzy trzema badanymi grupami chorych (astma, POChP i grupa kontrolna) nie zanotowaliśmy istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych cytokin. W przypadku płwociny indukowanej statystycznie wyższe stężenia periostiny i TSLP zarówno na poziomie białka jak i mRNA zostały odnotowane u chorych na astmę w stosunku do obu pozostałych grup (POChP i kontroli). Poziom białka obu markerów korelował dodatnio z liczbą eozynofili w płwocinie i stężeniami IL-4 i IL-13. Dodatkowo w grupie astmatyków zauważyliśmy silną, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem periostiny a TSLP, zarówno na poziomie białka, jak i mRNA. Zauważyliśmy także, że u 64% chorych na astmę eozynofilia w płwocinie współwystępowała z podwyższonymi poziomami periostiny i TSLP. W przypadku pacjentów z POChP taka sytuacja była obecna jedynie u 15% chorych.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że periostina i TSLP wykazują związek z eozynofilowym zapaleniem w drogach oddechowych i wydają się być ważnymi składnikami patofizjologii astmy atopowej. W przypadku POChP udział tych markerów jest dużo mniejszy i nieporównywalny do astmy. Według najlepszej wiedzy nasze badanie jest pierwszym, gdzie równocześnie określono stężenia periostiny i TSLP w surowicy i płwocinie u pacjentów z różnymi obturacyjnymi chorobami płuc. Wart podkreślenia jest także fakt, że ukazujemy związek pomiędzy periostiną, TSLP i składem komórkowym płwociny indukowanej, co do tej pory nie zostało opisane.

Uważamy, że wyniki naszego badania można uznać za wstępną, ale solidną podstawę do wskazania nowego zjawiska – współdziałania obu cytokin przynajmniej lokalnie w patofizjologii astmy. Nasze wnioski wydają się potwierdzać, że periostina może być biomarkerem eozynofilii dróg oddechowych u pacjentów z astmą i ma potencjalną użyteczność w doborze pacjentów do leczenia astmy z zapaleniem Th2. Wysokie poziomy TSLP w płwocinie mogą być indukowane przez nadmierną ekspresję periostiny w nabłonku dróg oddechowych, ale specyficzne mechanizmy leżące u podstaw jednoczesnego wzrostu lokalnych poziomów TSLP i periostiny w astmie wymagają dalszych badań w eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo*.

PUBLIKACJA NR 3

Nejman-Gryz P, Górską K, Krenke K, Peradzyńska J, Paplińska-Goryca M, Kulus M, Krenke R. Periostin concentration in exhaled breath condensate in children with mild asthma. *J Asthma*. 2019;58(1):60-68.

Poszukiwanie nowych, łatwo dostępnych biomarkerów astmy oraz stosowanie nieinwazyjnych metod diagnozowania, fenotypowania i monitorowania astmy jest szczególnie ważne u dzieci. Periostina, jako marker zapalenia eozynofilowego w astmie jest badana nie tylko w populacji dorosłych, ale również u dzieci. Ponieważ jest wydzielana przez osteoblasty należy pamiętać, że jej stężenia w surowicy krwi mogą być podwyższone w związku z typowymi dla wieku dziecięcego okresami wzrostu. Dlatego też w tej grupie pacjentów periostina ma ograniczone zastosowanie, jako marker chorób zapalnych, w tym astmy. W związku z tym w przypadku populacji dziecięcej celowe wydaje się oznaczanie jej stężeń w środowisku lokalnym np. w układzie oddechowym. W przypadku osób dorosłych materiałem odzwierciedlającym procesy toczące się w drogach oddechowych jest płwocina indukowana, której uzyskanie jest procedurą bezpieczną, łatwą do wykonania i nieinwazyjną. Uzyskanie tego materiału u dzieci jest trudne i mało wystandaryzowane, ponieważ małe dzieci mają kłopot z prawidłowym wykonaniem inhalacji i odkrztuszeniem odpowiedniej jakości płwociny. Materiałem z dróg oddechowych, który można pobrać w sposób prosty i nieinwazyjny jest kondensat powietrza wydychanego (*exhaled breath condensate* EBC), a jego zastosowanie u dzieci i dorosłych jest coraz powszechniejsze w badaniach chorób układu oddechowego. Chociaż w kondensatach pobranych od dzieci chorych na astmę zidentyfikowano i oznaczono wiele biocząsteczek, markerów zapalenia dróg oddechowych i stresu oksydacyjnego, według naszej wiedzy w literaturze brak jest danych dotyczących obecności periostiny w EBC. W związku z tym podjęliśmy się określenia stężenia periostiny w EBC u dzieci z łagodną astmą i spróbowaliśmy ocenić potencjalną przydatność periostiny w kondensacie, jako biomarkera choroby.

Było to badanie prospektywne, do którego włączono dzieci z łagodną astmą alergiczną oraz równie liczną grupę dzieci zdrowych. Od wszystkich uczestników badania uzyskano kondensat powietrza wydychanego oraz pobrano krew do dalszych oznaczeń. Wykazaliśmy, że pomiar stężeń periostiny w EBC był wykonalny, ale poziomy tego markera w kondensacie były kilkuset krotnie niższe niż w surowicy krwi. Nie znaleźliśmy istotnej różnicy między stężeniami periostiny w EBC u dzieci z astmą w stosunku do grupy kontrolnej. Nie stwierdziliśmy również istotnych różnic w poziomach periostiny u dzieci z astmą typu Th2 i innymi typami astmy. Stężenia periostiny w surowicy były ujemnie skorelowane z BMI i wiekiem nie tylko u chorych na astmę, ale także w grupie kontrolnej. Nasze wyniki mogą sugerować, że u dzieci z łagodną astmą ani EBC, ani surowica nie są odpowiednim materiałem do pomiaru stężenia periostiny w kontekście rodzaju zapalenia w drogach oddechowych. Zakładając, że w przypadku łagodnej astmy jeden biomarker może być niewystarczający do różnicowania pacjentów z różnymi endotypami astmy, w tym rodzajem zapalenia dróg oddechowych, przeprowadziliśmy dodatkową analizę obejmującą periostinę i dwa inne

biomarkery astmy (eozynofilię oraz stężenie tlenu azotu). Zauważyliśmy, że najwyższe poziomy periostiny stwierdzono u tych pacjentów, którzy charakteryzowali się zarówno wysoką liczbę eozynofili, jak i wysokim poziomem FeNO.

PUBLIKACJA NR 4

Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Proboszcz M, Kwiecień I, Hermanowicz-Salamon J, Grabczak E, Krenke R. Expression of TSLP and IL-33 receptors on sputum macrophages of asthma patients and healthy subjects. *J Asthma*.2020;57(1):1-10.

Makrofagi płucne są ważnymi komórkami układu odpornościowego zaangażowanymi w rozpoznawanie i niszczenie patogenów, usuwanie ich szczątków, a także w inicjację i regulację odpowiedzi zapalnej. Jeszcze do niedawna makrofagi uważano jedynie za jednojądrzaste komórki żerne, których rola ogranicza się do zniszczenia patogenu. Obecnie wiadomo, że zaangażowanie makrofagów w kształtowanie odpowiedzi immunologicznej jest znacznie szersze, a same makrofagi są traktowane, jako jedne z najważniejszych komórek układu immunologicznego cechujące się złożonością oraz wielostronnością w działaniu. Polaryzacja makrofagów w kierunku M1 bądź M2 zależy od środowiska lokalnego, w którym przebywają, w tym od stymulacji określonymi cytokinami. Zgromadzone dane sugerują, że dysfunkcja makrofagów może odgrywać rolę w patogenezie obturacyjnych chorób płuc. W większości badań dotyczących makrofagów płucnych wykorzystywano płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (*bronchoalveolar lavage fluid* BALf) zawierający głównie makrofagi pęcherzykowe (*alveolar macrophages* AM) lub biopsję z guzów płuc, które były bogate w makrofagi związane z guzem (*tumor associated macrophages* TAM). Znacznie mniej wiadomo o makrofagach oskrzelowych (*bronchial macrophages* BM) i ich subpopulacjach. Wykorzystywany przez nas materiał, jakim jest płwocina indukowana zawiera makrofagi pochodzące głównie z tchawicy i oskrzeli. Wiadomo, że makrofagi te są zdolne do reagowania na czynniki wywołujące zapalenie na tle alergicznym, w tym na cytokiny pochodzenia nabłonkowego (TSLP i IL-33). Wykazano, że komórki nabłonka oskrzeli od astmatyków konstytutywnie wykazują większą ekspresję TSLP i IL-33 niż komórki od osób zdrowych. Opisano także, że obie te alarminy wzmacniają polaryzację makrofagów w kierunku M2 poprzez wpływ na IL-4 i IL-13. Makrofagi odpowiadają na IL-33 przyczyniając się do indukcji odpowiedzi immunologicznej typu 2 poprzez produkcję IL-5 i IL-13. Powyższe wnioski wysnuto opierając się na doświadczeniach *in vitro* i na podstawie badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych. W obliczu małej ilości danych dotyczących tego zagadnienia u ludzi zaplanowaliśmy doświadczenia mające na celu lepsze poznanie tej tematyki. Postawiliśmy hipotezę, że w drogach oddechowych chorych na astmę działanie TSLP i IL-33 wiąże się z makrofagami typu M2, a nie innymi populacjami makrofagów.

Celem pracy była ocena ekspresji receptorów dla TSLP (TSLPR) i dla IL-33 (ST2 receptor) na makrofagach typu M2 pochodzących z płwociny indukowanej u chorych na astmę. Ekspresję receptorów określano wykorzystując metodę immunofluorescencji z użyciem przeciwciał dla CD206 (marker dla makrofagów typu M2) oraz przeciwciał dla TSLPR i ST2 na preparatach płwociny indukowanej. Do badania włączono dorosłych pacjentów chorych na astmę w stabilnej fazie choroby oraz zdrowych ochotników. Wykazaliśmy podwyższoną ekspresję receptorów dla TSLP i IL-33 na makrofagach typu M2 w grupie astmatyków. W tej samej grupie pacjentów zauważyliśmy zwiększoną ekspresję receptora dla TSLP także na makrofagach typu M1. Wyższa ekspresja obu badanych receptorów korelowała z dłuższym czasem trwania choroby i upośledzeniem funkcji płuc, wyrażonym nieprawidłowymi wynikami testów oddechowych. Zaobserwowaliśmy również podwyższoną liczbę makrofagów typu M1 z jednoczesną ekspresją TSLPR i ich korelację ze stężeniem całkowitego IgE u pacjentów z atopią.

W naszym badaniu po raz pierwszy opisano interakcje pomiędzy alarminami nabłonkowymi a makrofagami oskrzelowymi BM w przebiegu zapalenia typu Th2 w astmie. Uzyskane wyniki wskazują, że TSLPR i ST2 miały najwyższą ekspresję na makrofagach CD206+, ale jednocześnie nie wszystkie makrofagi CD206 wykazywały powierzchniową ekspresję TSLPR lub ST2. Na tej podstawie możemy postawić hipotezę, że ekspozycja czasowa na cytokiny wydzielane miejscowo w drogach oddechowych jest jednym z czynników wpływających na status polaryzacji makrofagów. Stąd makrofagi CD206+TSLPR/ST2-, obserwowane w naszym badaniu, mogły być populacją we wczesnym stadium polaryzacji. Dodatkowo możemy sądzić, że w patofizjologii astmy zarówno makrofagi CD206 dodatnie, jak i CD206 ujemne (typu M2 bądź M1) są zdolne do odpowiedzi do TSLP, ponieważ na obu typach makrofagów odnotowaliśmy ekspresję receptora dla TSLP, jednak do potwierdzenia tych informacji potrzebne są bardziej szczegółowe doświadczenia. W powyższym kontekście ważne jest, aby zdać sobie sprawę, że nasze badanie nie oceniało bezpośredniej roli TSLP i IL-33 w astmie i alergii, ale analizowało związki między makrofagami a receptorami tych cytokin. Bardziej szczegółowa analiza interakcji, między TSLP/IL-33 a polaryzacją makrofagów w zapaleniu alergicznym może być interesującym celem przyszłych badań.

PUBLIKACJA NR 5

Górska K, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Comparison of Thymic Stromal Lymphopoietin Concentration in Various Human Biospecimens from Asthma and COPD Patients Measured with Two Different ELISA Kits. *Adv Exp Med Biol.* 2017;955:19-27.

Prezentowana praca dotyczy oznaczenia stężeń TSLP w różnych materiałach (surowica krwi, płwocina indukowana, kondensat powietrza wydychanego) u chorych na astmę i POChP przy użyciu dwóch różnych zestawów ELISA. Oprócz wartości poszerzenia wiedzy podstawowej na temat użyteczności materiałów klinicznych z różnych poziomów dróg oddechowych, praca ma również wartość metodyczną i wzbudziła dość duże zainteresowanie wśród badaczy zajmujących się aspektami technicznymi wykonywanych oznaczeń.

Nasze zainteresowanie TSLP wynikało z faktu, że opisywana w warunkach *in vitro* ekspresja tej cytokiny w drogach oddechowych może przyczyniać się do kontroli lokalnej odpowiedzi dróg oddechowych na alergeny wziewne, jak ma to miejsce w astmie. Należy zauważyć, że w większości wcześniejszych badań oznaczano głównie stężenia TSLP w surowicy krwi, co pozwalało wyciągać wnioski dotyczące systemowego udziału tej cytokiny w odpowiedzi alergicznej. Brak było doniesień o udziale TSLP w regulacji odpowiedzi typu Th2 na poziomie lokalnym, co skłoniło nas do podjęcia tego tematu. Przeprowadzone badania wstępne (dane nieopublikowane) wykazały znaczące różnice w stężeniu TSLP w zależności od zestawów ELISA użytych do pomiaru. W związku z tym podjęliśmy badania mające na celu systematyczne porównanie stężenia TSLP mierzonego dwoma różnymi komercyjnymi zestawami ELISA w materiałach z różnych poziomów dróg oddechowych uzyskanych od pacjentów z astmą, POChP oraz od osób zdrowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom TSLP w tej samej próbce biologicznej różnił się znacznie w zależności od zestawu ELISA użytego do pomiaru, w ekstremalnych przypadkach stężenia różniły się nawet 50-krotnie. Największe różnice stwierdzono dla surowicy i płwociny, wartości stężeń TSLP w kondensacie nie odbiegały od siebie znacznie. Wydaje nam się, że rozbieżność uzyskanych danych może wynikać z faktu, że każdy producent zestawów ELISA używa do opłaszczenia płytki przeciwciał, które są mniej lub bardziej kompatybilne z oznaczaną substancją i mogą przyłączać także związki, których struktura w małym fragmencie jest tożsama z użytym przeciwciałem. Przeciwciałem jest głównym czynnikiem determinującym czułość i swoistość testu.

Innymi słowy oprócz poszukiwanego białka do płytki przyłączą się inne związki, które de facto nie są przez nas poszukiwane. Ma to ważne implikacje, jeśli chcemy porównywać własne wyniki z badaniami innych autorów, powinniśmy zwracać uwagę, jakie zestawy były użyte. Porównywanie wyników uzyskanych przy użyciu różnych testów może być mylące i prowadzić do błędnych wniosków.

PUBLIKACJA NR 6

Górska K, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Paplińska-Goryca M, Korczyński P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative Study of IL-33 and IL-6 Levels in Different Respiratory Samples in Mild-to-Moderate Asthma and COPD. *COPD*. 2018;15(1):36-45.

IL-6 i IL-33 biorą udział w procesie zapalenia w przebiegu obturacyjnych chorób płuc. W przeciwieństwie do IL-6 dane dotyczące ekspresji IL-33 w różnych materiałach biologicznych od pacjentów z astmą i POChP są ubogie i niepełne. Podwyższona ekspresja IL-33 była opisywana w komórkach nabłonka i komórkach mięśni gładkich u pacjentów z astmą, jednak udział IL-33 w mechanizmach POChP jest niejasny. Niektórzy autorzy sugerują, że IL-33 może promować przewlekłe zapalenie w przebiegu POChP zwiększając ekspresję IL-6 i IL-8. W przeciwieństwie do IL-33, funkcje i charakterystyka IL-6 są dużo lepiej poznane. Chociaż wykazano, że stężenia IL-6 w surowicy i indukowanej plwocinie są podwyższone zarówno w przypadku astmy, jak i POChP, IL-6 jest raczej postrzegana, jako typowa dla POChP. Niektórzy autorzy sugerują, że obecność IL-6 w drogach oddechowych pacjentów z astmą i POChP może być związana nie tylko z trwającym stanem zapalnym, ale także wynikać ze stanu „aktywacji” komórek nabłonka płuc.

Charakter i nasilenie zapalenia w drogach oddechowych można oceniać wykorzystując różne dostępne materiały biologiczne. Najbardziej wiarygodne dane pochodzą z badań, w których wykorzystano biopaty z oskrzeli. Ponieważ jednak uzyskanie próbek tkanek *in vivo* z dolnych dróg oddechowych wymaga stosunkowo inwazyjnych procedur, w licznych badaniach do oceny stanu zapalenia dróg oddechowych wykorzystano plwocinę indukowaną oraz kondensat powietrza wydychanego. Uważa się, że EBC odzwierciedla środowisko molekularne dolnych dróg oddechowych, natomiast IS składa się z komórek i wydzielin pochodzących głównie z dużych dróg oddechowych. Według naszej wiedzy dostępne dane dotyczące ekspresji IL-33 w drogach oddechowych opierają się głównie na kulturach komórkowych i modelach zwierzęcych. W literaturze brak jest danych opisujących zależności między ekspresją tkankową IL-33 a jej poziomami w innych materiałach z układu oddechowego. Dlatego podjęliśmy się oceny ekspresji IL-33 w błonie śluzowej oskrzeli pacjentów z astmą i POChP i porównania tej ekspresji ze stężeniami IL-33 i ekspresją mRNA w różnych próbkach z dróg oddechowych. W tych samych próbkach zmierzono ekspresję tkankową, mRNA i stężenie białka IL-6 w celu porównania wzorców ekspresji tej dobrze zbadanej prozapalnej cytokiny z wzorcami ekspresji IL-33.

Nasze badanie wykazało, że IL-33 jest wykrywalna w surowicy, IS i EBC nie tylko u chorych na astmę, ale także u chorych na POChP. W obu grupach chorych najwyższe stężenia IL-6 i IL-33 zanotowano w plwocinie indukowanej. We wszystkich badanych specymenach stężenia IL-33 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA były dużo niższe od stężeń IL-6. Poziomy IL-6 były statystycznie wyższe u chorych na POChP niż w pozostałych grupach badanych. Stopień ekspresji tkankowej IL-6 w próbkach błony śluzowej oskrzeli był istotnie wyższy u chorych POChP. Co ciekawe, ekspresja IL-33 w próbkach z oskrzeli była wysoka nie tylko u astmatyków, ale także u pacjentów z POChP. Stwierdziliśmy dodatnią korelację między poziomem IL-6 w plwocinie a liczbą paczkolat u chorych na POChP. W obu grupach pacjentów nie stwierdzono związku między stężeniem IL-33 a paleniem tytoniu.

Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie porównujące tkankową ekspresję IL-33 w ścianach oskrzeli ze stężeniami IL-33 w kondensacie i plwocinie. Ponieważ nie byliśmy w stanie znaleźć żadnych innych danych dotyczących stężeń IL-33 w surowicy i EBC u pacjentów z POChP i uważamy, że jest to pierwsze badanie poruszające ten problem. Nasze wyniki wskazują, że aktywacja IL-33 odgrywa ważną rolę w patomechanizmach zarówno astmy jak i POChP.

PUBLIKACJA NR 7

Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, Proboszcz M, **Nejman-Gryz P**, Górską K, Krenke R. The Expressions of TSLP, IL-33, and IL-17A in Monocyte Derived Dendritic Cells from Asthma and COPD Patients are Related to Epithelial–Macrophage Interactions. *Cells*. 2020;9(9):1944

Komórki dendrytyczne występują w dużej ilości na powierzchni błony śluzowej stanowiącej połączenie między środowiskiem zewnętrznym, a wewnętrznym. Ponieważ mają stały kontakt z antygenami uważa się, że są kluczowymi regulatorami w inicjacji i modulacji odpowiedzi immunologicznej w przebiegu astmy i POChP. Wraz z makrofagami ściśle współpracują z nabłonkiem dróg oddechowych będącym pierwszą linią bariery kontaktowej w układzie oddechowym. Nabłonek dróg oddechowych reguluje ekspresję kluczowych modulatorów odpowiedzi immunologicznej, w której biorą udział komórki dendrytyczne, takich jak IL-1, IL-6, IL-8 czy czynnik martwicy nowotworu. Interakcje pomiędzy nabłonkiem a komórkami dendrytycznymi wydają się być kluczowe dla przebiegu procesu uczulenia alergicznego, w tym dla roli czynników genetycznych i środowiskowych. Ważnymi modulatorami funkcjonowania komórek dendrytycznych są alarminy pochodzenia nabłonkowego (TSLP i IL-33). TSLP stymuluje komórki dendrytyczne promując wytwarzanie TNF α zarówno w odpowiedzi typu Th1 jak i Th2. Co istotne komórki dendrytyczne nie tylko odpowiadają na TSLP i IL-33 ze źródeł zewnętrznych, ale same mogą również wytwarzać te cytokiny. IL-33 aktywuje komórki dendrytyczne podczas prezentacji antygeny i zwiększa ich zdolność do pobudzania limfocytów Th2. W przeciwieństwie do TSLP i IL-33, IL-17A nie jest cytokiną pochodzenia nabłonkowego, ale jest ważnym aktywatorem funkcji komórek dendrytycznych, niezwiązanej z odpowiedzią typu Th2. Biorąc pod uwagę ważną rolę cytokin TSLP, IL-33 i IL-17A w patofizjologii obturacyjnych chorób płuc, podjęliśmy się zbadania czy interakcje między nabłonkiem a makrofagami wpływają na ekspresję TSLP, IL-33 i IL-17A przez komórki dendrytyczne w astmie i POChP.

W eksperymentach wykorzystaliśmy hodowle *in vitro* komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów (moDC), makrofagów pochodzących z monocytów (moM) i komórek nabłonka dróg oddechowych pobrane z astmatyków, chorych na POChP i osób zdrowych. Od uczestników badania pobieraliśmy krew oraz wymaz szczoteczkowy z nosa i po izolacji komórek prowadziliśmy hodowle metodą ALI (*air-liquid interface*) umożliwiającą namnażanie wysianych komórek nabłonka oddechowego oraz ich zróżnicowanie w kierunku orzęsionego nabłonka oddechowego oraz metodą potrójnych kokultur z wykorzystaniem komórek nabłonka nosa z makrofagami i komórkami dendrytycznymi. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie, w którym oceniano wpływ interakcji między komórkami dendrytycznymi i komórkami nabłonka hodowanymi wspólnie z makrofagami na ekspresję TSLP, IL-33 i IL-17A w przebiegu astmy i POChP. Stwierdziliśmy, że kokultura nabłonka i makrofagów istotnie zwiększała ekspresję mRNA dla TSLP w grupie astmatyków oraz w mniejszym stopniu lub nie zmieniała ekspresji mRNA dla IL-33 i IL-17A. Wykazaliśmy również istotne różnice w ekspresji mRNA badanych cytokin między obturacyjnymi chorobami płuc a grupą kontrolną oraz między astmą a POChP. Komórki dendrytyczne od astmatyków charakteryzowały się najwyższą ekspresją mRNA dla TSLP i największą liczbą

receptorów dla TSLP, IL-33 i IL-17A. U pacjentów z POChP nie zaobserwowaliśmy żadnych zmian w ekspresji mRNA dla TSLP, IL-33 lub IL-17A w żadnym z zastosowanych modeli kokultur. Ponadto wykazaliśmy podwyższoną liczbę receptorów dla TSLP i IL-17A na komórkach dendrytycznych od pacjentów z POChP, co sugeruje ważną rolę komórek dendrytycznych w POChP. Podsumowując, wyniki naszej pracy sugerują, że odmienna regulacja funkcji komórek dendrytycznych w obturacyjnych chorobach płuc może być związana ze złożonymi interakcjami komórka-komórka, ze szczególnym uwzględnieniem dysfunkcji nabłonka dróg oddechowych. Nasze wyniki wskazują również na możliwy związek pomiędzy funkcjami komórek dendrytycznych a szlakiem IL-17A, dodatkowo komórki te mogą być potencjalnym źródłem TSLP i IL-33 w drogach oddechowych. U pacjentów z astmą kokultura komórek dendrytycznych z komórkami nabłonka i makrofagami charakteryzuje się podwyższoną ekspresją mRNA dla TSLP. Komórki dendrytyczne pacjentów z astmą i POChP różnią się wzorem odpowiedzi immunologicznej i interakcjami z komórkami strukturalnymi.

PODSUMOWANIE

Wyniki prac stanowiących osiągnięcie naukowe są nie tylko źródłem nowych danych na temat udziału cytokin pochodzenia nabłonkowego w patofizjologii chorób obturacyjnych układu oddechowego, ale stanowią pionierski wkład na rzecz poznania interakcji pomiędzy komórkami nabłonka, komórkami napływowymi oraz cytokinami nabłonkowymi w astmie i POChP.

W kolejnych badaniach stanowiących osiągnięcie naukowe:

- dowiedziono, że białka pochodzenia nabłonkowego (TSLP, IL-25, IL-33, periostina) odgrywają ważną rolę w procesie zapalenia dróg oddechowych w chorobach obturacyjnych
- potwierdzono, że białka te są wykrywalne za poziomie ogólnoustrojowym (surowica), a także w materiałach odzwierciedlających proces zapalenia na poziomie lokalnym (plwocina indukowana, kondensat powietrza wydychanego, wycinki tkankowe z oskrzeli) w drogach oddechowych osób z chorobami obturacyjnymi
- wykazano współdziałanie i wzajemne interakcje pomiędzy makrofagami, komórkami dendrytycznymi i cytokinami pochodzenia nabłonkowego w przebiegu reakcji alergicznej w astmie
- poszerzono wiedzę na temat kooperacji między periostiną i TSLP w zapaleniu typu Th2, wskazując jednocześnie, że związki te mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu astmy typu Th2

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Tło immunologiczne w obturacyjnych chorobach płuc było przedmiotem moich zainteresowań od początku mojej pracy naukowej. Poniżej przedstawiam najważniejsze publikacje dotyczące tego tematu, które nie zostały włączone do cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

Moje najwcześniejsze publikacje dotyczyły badań przeprowadzanych na zwierzęcych modelach chorób obturacyjnych, głównie astmy alergicznej.

- **Nejman-Gryz P, Grubek-Jaworska H, Glapiński J, Chazan R.** Effect of phosphodiesterase 4 inhibitor (rolipram) on experimental allergic asthma-guinea pig model. *Pneumonol Alergol Pol.* 2006;74:106–112.

- **Nejman-Gryz P**, Grubek-Jaworska H, Glapiński J, Hoser G, Chazan R. Effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on lung resistance and inflammatory reaction in experimental asthma. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl 4:229–239. IF 2,974

Modele zwierzęce cieszą się dużym zainteresowaniem wśród badaczy; niejednokrotnie oparte na inwazyjnych procedurach pozwalają na prowadzenie badań w sposób, który byłby niemożliwy u ludzi. Modelem z wyboru w naszych doświadczeniach były świnki morskie, gdyż spośród wszystkich zwierząt laboratoryjnych ich układ oddechowy jest najbardziej zbliżony do układu oddechowego człowieka. Przewaga tego modelu nad innymi modelami zwierzęcymi wynika z obecności cech odpowiedzi alergicznej identycznych z ludzkimi: płuca świnek są głównym organem szoku anafilaktycznego, drogi oddechowe reagują na histaminę, pojawiają się dwie fazy reakcji astmatycznej -wczesna (EAR-*early asthmatic reaction*) i późna (LAR-*late asthmatic reaction*), a w czasie trwania LAR do przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej napływają eozynofile. Pierwsze prowadzone przeze mnie doświadczenia dotyczyły oceny wpływu rolipramu- inhibitora fosfodiesterazy 4 (PDE4) – na przebieg eksperymentalnej reakcji astmatycznej u świnek morskich oraz porównanie na tym modelu doświadczalnym aktywności rolipramu i deksametazonu. PDE4 jest enzymem swoistym dla cAMP i należy do rodziny, izoenzymów, która jest jednym z ważnych molekularnym celów dla nowoczesnych leków przeciwastmatycznych. Selektywne inhibitory fosfodiesterazy 4-tej są nową grupą leków łączących działanie przeciwzapalne z działaniem rozszerzającym oskrzela. Przeanalizowano skład komórkowy płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALf) oraz wartości oporu płucnego we wczesnej i późnej fazie reakcji astmatycznej u świnek. Wywnioskowano, że jednorazowe podanie rolipramu przed prowokacją alergenową ogranicza wzrost oporu oddechowego, zmniejsza napływ eozynofili i hamuje uwalnianie histaminy podczas wczesnej fazy alergicznej reakcji astmatycznej na modelu świnki morskiej.

Kolejne doświadczenia przeprowadzone na modelu zwierzęcym związane były z realizacją grantu dotyczącego oddziaływania nanostruktur węglowych na układ oddechowy w warunkach *in vivo* na modelu świnki morskiej. Grant realizowany był we współpracy z wydziałem chemii Uniwersytetu Warszawskiego, a kierował nim dr hab. Andrzej Huczko pionier badań nad fulerenami i nanorurkami węglowymi w Polsce. Efektem były publikacje, z których jedna powstała we współpracy z laureatem nagrody Nobla z chemii za odkrycie fulerenów (1996) sir Haroldem Walterem Kroto.

- Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Grubek-Jaworska H, **Nejman P**, Przybyłowski T, Czumińska K, Glapiński J, Walton DWR, Kroto H. Pulmonary Toxicity of 1-D nanocarbons materials. *Fuller Nanotub.* 2005;13:141–145. IF 0,776
- Grubek-Jaworska H, **Nejman P**, Czumińska K, Przybyłowski T, Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Chazan R. Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon* 2006;44:1057–1063. IF 3,884
- Huczko A, Lange H, Sioda M, Bystrzejewski M, **Nejman P**, Grubek-Jaworska H, Czumińska K, Glapiński J. Pathogenic Activity of 1D Nanocarbons: *In Vivo* Studies on Guinea Pigs AIP Conference Proceedings American Institute of Physics, Sacramento, USA, 4-5 August, 2004

Znaczna część aktualnych światowych badań w dziedzinie nanotechnologii dotyczy węgla, a zwłaszcza jego dwóch podstawowych nowo odkrytych odmian nanostrukturalnych tj. fulerenów i nanorurek węglowych (*carbon nanotubes* CNTs). CNTs są cząsteczkami bardzo mobilnymi w żywym organizmie i łatwo przenikają przez błony biologiczne, skórę, mieszki włosowe, drogi oddechowe i przewód pokarmowy, a te cechy sprawiają, że CNTs mogą stać się przydatnym materiałem, jako nośniki leków, genów czy szczepionek. Wdychanie ultra drobnych nanostruktur węglowych może

powodować reakcję zapalną w płucach. W projekcie skoncentrowano się na badaniu toksyczności/patogenności nanostruktur węglowych, które mogą być wykorzystane praktycznie, jako nośnik nowoczesnych leków w układzie oddechowym. Stosując model zwierzęcy (świnka morska) badaliśmy wpływ podawanych dotchawczo nanostruktur węglowych na płuca. Trzymiesięczna ekspozycja na podane CNTs prowadziła do rozwoju idiopatycznego zarostowego zapalenia oskrzelików z organizującym się zapaleniem płuc (*bronchiolitis obliterans organizing pneumonia* BOOP) oraz zwłóknienia płuc. Zaobserwowano również infiltrację komórek zapalnych do płuc i wzrost stężenia IL-8 u zwierząt badanych w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki naszych prac wskazują, że dotchawczo podane nie funkcjonalizowane nanorurki węglowe odgrywają ważną rolę w indukcji wymierzalnych zmian patologicznych w układzie oddechowym świnek morskich, a ekspozycja na wysokie stężenie CNTs prowadzi do rozwoju ziarniniaków u gryzoni.

Dalsza część mojego dorobku publikacyjnego wynikała z zainteresowania mechanizmami prowadzącymi do zapalenia na poziomie komórkowym i związanymi z tym zmianami strukturalnymi w drogach oddechowych u pacjentów z obturacyjnymi chorobami płuc. Poniżej przedstawiam najważniejsze publikacje dotyczące tego tematu, które nie zostały włączone do cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

- Górska K, Krenke R, Domagała-Kulawik J, Korczyński P, **Nejman-Gryz P**, Kościuch J, Hildebrand K, Chazan R. Comparison of cellular and biochemical markers of airway inflammation in patients with mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease: an induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid study. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 6:271–283. IF 2,631

Praca dotyczyła porównania komórkowych i biochemicznych cech zapalenia w drogach oddechowych u pacjentów z astmą i POChP. Oceniano wybrane markery zapalenia (IL-8 i mieloperoksydazę -MPO) w płwocinie indukowanej i w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALf) u chorych z łagodną i umiarkowaną postacią astmy i POChP. Badanie przeprowadzono u 22 osób chorych na astmę i 17 chorych na POChP o łagodnym lub umiarkowanym przebiegu, którzy nie otrzymywali leków przeciwzapalnych. Nie znaleźliśmy istotnych różnic w całkowitej i odsetkowej liczbie komórek w płwocinie między pacjentami z astmą i POChP, natomiast różnice takie były widoczne w BALf. Odnotowano zwiększoną liczbę makrofagów w grupie POChP oraz znacznie podwyższoną liczbę eozynofiliów u astmatyków. W obu badanych grupach nie wykazaliśmy istotnych korelacji między składem komórkowym płwociny indukowanej i BALf. Stężenie IL-8 w płwocinie i BALf było istotnie wyższe u chorych na POChP w porównaniu z chorymi na astmę, a poziom MPO w BALf był istotnie wyższy u chorych na POChP w porównaniu z chorymi na astmę. Wnioskowaliśmy, że na podstawie porównania składu komórkowego i stężenia mediatorów zapalnych w płwocinie nie można różnicować astmy i POChP. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, jako materiał pochodzący z obwodowych dróg oddechowych w większym stopniu pozwala na różnicowanie astmy i POChP. Było to jedno z pierwszych doniesień, które wskazywało na podobieństwo stanu zapalnego we wczesnych stadiach tych dwóch chorób obturacyjnych.

- Paplińska-Goryca M, Hermanowicz-Salamon J, **Nejman-Gryz P**, Białek-Gosk K, Rubinsztajn R, Arcimowicz M, Placha G, Góra J, Chazan R, Grubek-Jaworska H. Expression of eotaxins in the material from nasal brushing in asthma, allergic rhinitis and COPD patients. *Cytokine.* 2012;60:393–399. IF 2,517

Celem pracy była ocena ekspresji eotaksyn (CCL11, CCL24, CCL26) w wymazach szczoteczkowych nosa chorych na astmę, POChP i alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do osób zdrowych. Eotaksyny są silnymi chemoatraktantami głównie dla eozynofiliów, ale również dla innych

typów komórek. Te małe chemokiny wraz z receptorem CCR3 są bardzo ważnymi wskaźnikami reakcji alergicznej. Dowiedziono, że powodują napływ eozynofiliów do przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej w astmie, a także, że ulegają podwyższonej ekspresji w alergicznym nieżycie nosa. Dodatkowo oceniono cytologię wymazów pobranych z nosa. Wykazaliśmy zwiększoną ekspresję eotaksyn w materiale ze szcztokowania nosa we wszystkich badanych grupach pacjentów w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Najniższą ekspresję obserwowano u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa poza sezonem pylenia. W naszym badaniu ekspresja poszczególnych eotaksyn różniła się istotnie między grupami pacjentów: ekspresja eotaksyny CCL11 była najwyższa u pacjentów z POChP, a CCL24 była istotnie najwyższa u astmatyków. Podwyższony poziom wszystkich trzech eotaksyn obserwowaliśmy u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa w sezonie pylenia. Zanotowaliśmy również dodatnią korelację pomiędzy poziomem CCL26 a testami oddechowymi i ujemną korelację pomiędzy tymi samymi czynnikami w astmie. Wnioskujemy, że eotaksyny są kluczowymi czynnikami reakcji alergicznych, astmatycznych, ale także zapalnych w przebiegu POChP. Nasze wyniki wskazują na podwójną rolę CCL26, która jest chemoatraktantem dla eozynofiliów w astmie i jednocześnie może być negatywnym regulatorem napływu neutrofilów w POChP. Nasze wyniki silnie wspierają koncepcję funkcjonalnego związku między górnymi i dolnymi drogami oddechowymi i wskazują na kluczową rolę CCL26 w patofizjologii astmy.

Jako kontynuacja tematyki związku funkcjonalnego pomiędzy górnymi i dolnymi drogami oddechowymi- „*united airway*” powstała kolejna praca.

- Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Chazan R, Grubek-Jaworska H. The expression of the eotaxins IL-6 and CXCL8 in human epithelial cells from various levels of the respiratory tract. *Cell Mol Biol Lett.* 2013;18:612–630. IF 1,782

W tym badaniu porównywaliśmy normalne ludzkie komórki nabłonkowe z różnych poziomów dróg oddechowych pod kątem ich reaktywności na stymulację proalergiczną i prozapalną. Oceniano ekspresję eotaksyn, IL-6 i CXCL8 po stymulacji mediatorami reakcji alergicznej (IL-4 lub IL-13 oraz wpływ prestymulacji IFN- γ na tę aktywność) i mediatorami prozapalnymi (TNF- α , LPS) w komórkach nabłonka nosa, oskrzeli i małych dróg oddechowych. Wszystkie typy nabłonków wydzielają CCL26, IL-6 oraz IL-8 po stymulacji IL-4 bądź IL-13. Prestymulacja IFN- γ prowadziła do obniżenia ekspresji CCL-26 i wzrostu stężenia IL-6 w komórkach nabłonka nosa, natomiast efekt ten był niewidoczny w hodowlach nabłonka oskrzeli. Stymulacja prozapalna skutkowała produkcją IL-6 i CXCL8 w komórkach nabłonka ze wszystkich badanych poziomów. Wykazaliśmy, że komórki nabłonkowe z różnych poziomów dróg oddechowych współdziałają ze sobą reagując w podobny sposób na stymulację IL-4 i IL-13, wykazując podobną reaktywność na TNF- α i LPS, dając niemal zunifikowaną odpowiedź na prestymulację IFN- γ . Oceniane normalne ludzkie komórki nabłonka nosa, oskrzeli i małych dróg oddechowych są podobne, ale nie identyczne pod względem reaktywności immunologicznej. Chociaż bezwzględne ilości wytwarzanych cytokin różnią się między komórkami nabłonkowymi z różnych poziomów dróg oddechowych, możemy wnioskować, że komórki nabłonka nosa, oskrzeli i małych dróg oddechowych działają w podobny sposób.

Wyniki kolejnej pracy dały dowód na podobieństwo w przebiegu astmy i POChP w łagodnej bądź umiarkowanej postaci choroby.

- Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Górska K, Białek-Gosk K, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. Expression of Inflammatory Mediators in Induced Sputum: Comparative Study in Asthma and COPD. *Adv Exp Med Biol.* 2016;1–13. IF 1,937

Celem badania była ocena ekspresji mRNA dla wybranych cytokin (IL-6, IL-13, CXCL8, TSLP, IL-33, IL-25, IL-17, ECP, tryptazy mastocytów, CCL24 i CCL26) w komórkach z płwociny indukowanej od chorych na astmę i POChP, a także charakterystyka związku pomiędzy poziomem ekspresji mediatorów a fenotypami komórkowymi astmy i POChP. Do badania włączono pacjentów chorych na astmę, POChP i grupę zdrowych ochotników. Oznaczenia ekspresji genów wykonano metodą *real-time* PCR. Spośród wszystkich parametrów jedynie ekspresja CXCL8 różniła istotnie astmę i POChP, a także korelowała z odsetkiem neutrofilów w płwocinie w obu badanych grupach. Zauważyliśmy również, że poziom ekspresji IL-17 był istotnie niższy u pacjentów z astmą atopową vs. nieatopową. Odsetek makrofagów korelował ujemnie z ekspresją tryptazy i ECP w COPD, i z CLCX8 w astmie. Dodatkowo ekspresja ECP była ujemnie skorelowana z nasileniem objawów POChP mierzonym za pomocą kwestionariusza CAT (*COPD assessment test*). Wnioskujemy, że astma i POChP wykazują istotne nakładanie się profilu cytokin zapalnych w drogach oddechowych, w związku, z czym różnicowanie tych obu chorób obturacyjnych na podstawie jednej cytokiny jest praktycznie niemożliwe.

Następna praca dotyczyła analizy typu zapalenia w drogach oddechowych osób chorych na astmę i POChP.

- Górska K, Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Goryca K, Krenke R. Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD*. 2017;14(2):181-189. IF 2,576

Chociaż generalnie charakter zapalenia dróg oddechowych u pacjentów z astmą i POChP różni się znacznie, istnieją pewne zmiany zapalne, które można zaobserwować w obu chorobach. Dotyczy to w szczególności łagodnych stadiów astmy i POChP oraz pewnych fenotypów chorób, np. niealergiczej astmy Th1 zależnej u osób starszych, która może mieć bardzo podobne cechy do POChP. Chociaż eozynofilia i przebudowa dróg oddechowych są cechami charakterystycznymi astmy, u niektórych pacjentów z astmą obecne jest zapalenie nie eozynofilowe. Astma neutrofilowa jest odrębnym fenotypem astmy ze słabą odpowiedzią na steroidy i zapaleniem systemowym, które są typowymi cechami POChP. Poprawa skuteczności leczenia jest nadrzędnym celem badań podejmowanych dla lepszego i dokładniejszego określenia fenotypu choroby. Dlatego określenie rodzaju zapalenia dróg oddechowych w astmie i POChP może być przydatne nie tylko w różnicowaniu między obiema jednostkami, ale także w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie. Celem naszego projektu była charakterystyka fenotypu astmy i POChP za pomocą komórkowych i biochemicznych markerów zapalenia eozynofilowego i neutrofilowego. Do badania włączono chorych na astmę i POChP w łagodnej i umiarkowanej postaci choroby, nieprzyjmujących kortykosteroidów. Oceniano skład komórkowy krwi obwodowej oraz płwociny indukowanej oraz stężenia wybranych cytokin związanych z zapaleniem neutrofilowym i eozynofilowym w ww. materiałach. W analizie statystycznej zastosowano hierarchiczne grupowanie (klasteryzowanie) na podstawie kombinacji wybranych cech klinicznych i mediatorów zapalenia. Na podstawie analizy klasterowej wykazaliśmy, że eozynofile i neutrofile są ważnymi wyznacznikami fenotypów w astmie i POChP. Analiza klasterowa na podstawie odsetka eozynofilów we krwi wykazała dwa klastry w astmie różniące się liczbą dodatnich testów skórnych oraz jeden klaster POChP z dwoma podgrupami charakteryzującymi się niską i wysoką eozynofilią obwodową. Analiza klasterowa w oparciu o skład komórkowy płwociny indukowanej ujawniła dwa klastry, z których jeden stanowiła „czysta” astma atopowa z wysoką eozynofilią, a drugi astma mieszana z POChP z niską eozynofilią/atopią. Wyniki naszej pracy wskazują, że fenotypowanie astmy i POChP w oparciu o cechy komórkowe lub fizjologiczne może pomóc w identyfikacji podgrup pacjentów, którzy odniosą szczególną korzyść ze zindywidualizowanego leczenia.

Kolejna praca dotyczyła określenia stężeń i roli receptora sTREM w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u pacjentów z astmą i POChP

- Proboszcz M, Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Górka K, Krenke R. Comparative study of soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (sTREM-1), IL-6 and IL-13 concentration in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and COPD- a preliminary study. *Adv Exp Med Biol.* 2017;26: 231–236. IF 1,179

sTREM-1 jest receptorem powierzchniowym prezentowanym na neutrofilach, makrofagach i monocytach. Podwyższone poziomy sTREM-1 są markerem ostrej infekcji drobnoustrojowych i są również opisywane w przewlekłych chorobach płuc. IL-6 i IL-13 są klasycznymi markerami w rozróżnianiu chorób obturacyjnych. Wykazano, że IL-6 odgrywa ważną rolę w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, podczas gdy IL-13 jest opisywana, jako jeden z kluczowych mediatorów astmy alergicznej. Celem pracy była ocena poziomu sTREM-1 w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u pacjentów ze stabilną łagodną i umiarkowaną astmą i POChP oraz porównanie przydatności pomiarów sTREM w BALf w różnicowaniu astmy/POChP w odniesieniu do IL-6 i IL-13. Nie stwierdziliśmy istotnych różnic w poziomach sTREM-1 w BALf między pacjentami z astmą i POChP, w przeciwieństwie do różnic stosunku IL-6/IL-13. Sugerujemy, że sTREM-1 nie nadaje się do różnicowania obturacyjnych chorób płuc w ich stabilnej fazie, jednocześnie potwierdzając, że pomiar innych biomarkerów w BALf, stosunek IL-6/IL-13, może skuteczniej odróżniać astmę od POChP. Wyniki te sugerują, że najważniejszy marker stanu zapalnego w łagodnych/umiarkowanych postaciach chorób obturacyjnych nie jest zależny od mikrobiomu płuc. Według wiedzy autorów jest to pierwsze badanie porównujące stężenie BALf sTREM-1 u chorych na astmę i POChP, do tej pory oceniano jedynie poziomy sTREM-1 w surowicy/osoczu.

Wyniki zaprezentowanych wyżej prac doprowadziły do zainteresowania się w szczególności interakcjami pomiędzy komórkami napływowymi (zwłaszcza makrofagami i eozynofilami), komórkami nabłonka dróg oddechowych i cytokinami, które wspólnie tworzą środowisko lokalne odgrywające ważną rolę w patofizjologii chorób obturacyjnych. Przedstawione poniżej publikacje stanowią wstęp do prac tworzących cykl stanowiący osiągnięcie naukowe.

- Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Krenke R. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on TSLP, IL-33 and IL-25 expression in respiratory epithelium. *Eur. Cytokine Netw.* 2016;27: 54–62. IF 2,364

Praca miała na celu zbadanie wpływu aktywnej formy witaminy D na ekspresję wybranych mediatorów zapalenia alergicznego w komórkach nabłonka dróg oddechowych. Doświadczenia wykonano na liniach pierwotnych nabłonka nosa oraz nabłonka oskrzelowego, poddając je ekspozycji na witaminę D i następnie stymulując mediatorami prozapalnymi (IL-4, TNF α , LPS, poli I:C). Po 24 godzinach w hodowlach komórkowych określano stężenia TSLP, IL-25 i IL-33 na poziomie białka (ELISA) i genu (*real-time* PCR). Stwierdziliśmy, że w komórkach niestymulowanych witamina D podwyższyła ekspresję TSLP, ale nie wpływała na poziomy IL-33 i IL-25. W komórkach stymulowanych wpływ witaminy D różnił się w zależności od czynnika stymulującego, w przypadku IL-4 i LPS Wit. D hamowała ekspresję TSLP i IL-33, jednocześnie prowadząc do wzmożonej produkcji IL-25. Nasze badanie pokazało, że witamina D reguluje ekspresję TSLP, IL-33 i IL-25 w hodowlach nabłonka dróg oddechowych w różny sposób, w zależności od modelu eksperymentalnego. Nasze wyniki wskazują na dwoistą naturę witaminy D3, przejawiającą się zarówno działaniem pro- jak i przeciwzapalnym obserwowanym *in vitro* w komórkach nabłonka dróg oddechowych. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie „*in vitro*”, w którym oceniono wpływ witaminy D na ekspresję IL-33 i IL-25 zarówno w niestymulowanych, jak i stymulowanych hodowlach komórek nabłonka dróg

oddechowych. W kontekście związku między astmą a witaminą D3 w literaturze można dostrzec zagadkowy paradoks polegający na tym, że badania epidemiologiczne wykazały związek między niedoborem witaminy D3 a ryzykiem cięższej astmy oraz że suplementacja witaminy D3 u astmatyków jest zalecana przez wielu klinicystów, podczas gdy niektóre badania *in vitro* wykazały, że witamina D3 może bezpośrednio promować wydzielanie cytokin Th2. Uważamy, że wyniki naszego badania mogą wzbogacić obecną wiedzę na temat związku między ekspozycją na witaminę D3 a proalergiczną aktywnością komórek nabłonka dróg oddechowych o nowe dane.

- Górska K, Maskey-Warzęchowska M, **Nejman-Gryz P**, Korczyński P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative study of periostin expression in different respiratory samples in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126: 124–137. IF 2,309

Praca dotyczyła oceny ekspresji periostiny w różnych materiałach pochodzących od pacjentów z łagodną/umiarkowaną astmą i POChP, a także oceny związku między ekspresją periostiny a klinicznymi cechami astmy i POChP. Periostina jest uważana za marker zapalenia eozynofilowego u pacjentów z astmą. Jednak nie ma danych literaturowych dotyczących periostiny u pacjentów z POChP. Periostina była oceniana w surowicy, płwocinie indukowanej, kondensacie powietrza wydychanego i płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALf oraz w próbkach z biopsji oskrzeli u chorych na astmę, POChP i w grupie kontrolnej. Przeanalizowano również korelacje między poziomami periostiny w różnych materiałach i porównano stężenia periostiny między chorymi na astmę a chorymi na POChP. W niniejszym badaniu wykazano, że stężenia periostiny są wykrywalne w surowicy, IS, EBC i BALf uzyskane nie tylko od chorych na astmę, ale także od chorych na POChP, z istotnymi różnicami między tymi dwiema grupami. Stężenie periostiny w EBC i ekspresja tkankowa periostiny są wyższe u chorych na astmę niż u chorych na POChP. Stężenia periostiny w EBC mogą służyć, jako potencjalny marker zastępczy ekspresji periostiny w tkankach. Nie stwierdziliśmy jednak żadnych korelacji w stężeniach periostiny między badanymi materiałami ani istotnych korelacji między stężeniem periostiny a ekspresją tkankową. Nie znaleźliśmy różnic w stężeniach periostiny w surowicy, IS, BALf i EBC między pacjentami z różnymi fenotypami obu chorób. Według naszej wiedzy jest to jedyne dotychczas badanie, w którym porównano stężenia periostiny w różnych próbkach z dróg oddechowych. Nie zidentyfikowaliśmy również żadnych wcześniejszych badań, w których autorzy mierzyli poziom periostiny w EBC. Dodatkowo, ponieważ nie byliśmy w stanie znaleźć żadnych innych danych dotyczących periostiny u pacjentów z POChP, uważamy, że jest to pierwsze badanie poruszające ten problem.

- Papińska-Goryca M, Grabczak EM, Dąbrowska M, Hermanowicz-Salamon J, Proboszcz M, **Nejman-Gryz P**, Maskey-Warzęchowska M, Krenke, R. Sputum interleukin-25 correlates with asthma severity: a preliminary study. *Postepy Dermatol Alergol.* 2018;35:462-469 IF 1,407

Interleukina 25 jest cytokiną pochodzenia nabłonkowego, związaną z alergicznym zapaleniem Th2. Jednak niewiele wiadomo na temat roli IL-25 w różnych fenotypach astmy i jej związku z nasileniem choroby. Większość dostępnych do tej pory danych dotyczących aktywności IL-25 pochodzi z badań na modelach zwierzęcych. Przeprowadzono tylko kilka badań na ludziach oceniających rolę IL-25 w astmie. W obliczu skąpych danych z badań na ludziach dotyczących roli IL-25 w astmie podjęliśmy badania mające na celu ocenę ekspresji mRNA IL-25 i stężenia białka IL-25 w indukowanej płwocinie astmatyków z różnymi fenotypami astmy i nasileniem choroby, ocenę związku między ekspresją/poziomem IL-25 w płwocinie a cechami klinicznymi astmy ze szczególnym uwzględnieniem fenotypów komórkowych. Do badania włączono pacjentów z astmą łagodną,

umiarkowaną, ciężką, chorych z kaszlowym wariantem astmy (*cough variant asthma* CVA) oraz osoby zdrowe. Nie stwierdziliśmy różnic w stężeniu IL-25 na poziomie mRNA oraz białka w płwocinie indukowanej między grupą kontrolną a całą grupą z astmą. W szczegółowej analizie zaobserwowaliśmy niższą ekspresję mRNA dla IL-25 w ciężkiej astmie w porównaniu z CVA i kontrolami. Stężenie białka IL-25 w supernatantach płwociny było podwyższone u pacjentów z ciężką astmą w porównaniu z grupą kontrolną, CVA i astmą łagodną do umiarkowanej, a także u pacjentów z astmą atopową w porównaniu do astmy nieatopowej. Podwyższona ekspresja IL-25 wiązała się z niższym odsetkiem eozynofili i wyższym odsetkiem neutrofilii w drogach oddechowych chorych na astmę. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie oceniające stężenie IL-25 w różnych fenotypach astmy, szczególnie w CVA i ciężkiej astmie. Stwierdziliśmy, że pacjenci z ciężką astmą byli jedyną podgrupą ze znacznie zwiększonym poziomem IL-25 w porównaniu z grupą kontrolną. Nasze wyniki sugerują, że IL-25 jest szczególnie związana z ciężką astmą. Związek między IL-25 a neutrofilowym zapaleniem dróg oddechowych sugeruje plejotropową rolę IL-25 w odpowiedzi immunologicznej w tej chorobie.

- Paplińska-Goryca, M, Goryca K, Misiukiewicz P, **Nejman-Gryz P**, Górską K, Krenke R. Genetic characterization of macrophages from induced sputum of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Intern Med.* 2018;128:559-562. IF 2,658

Makrofagi płucne są ważnymi efektorowymi komórkami odpornościowymi, które biorą udział w rozpoznawaniu patogenów, eliminowaniu drobnoustrojów, inicjowaniu i regulacji odpowiedzi zapalnej oraz odporności nabytej. Niektóre dane sugerują, że dysfunkcja makrofagów może odgrywać rolę w patogenezie obturacyjnych chorób płuc. Większość badań dotyczących charakterystyki makrofagów dotyczyła płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, który zawiera głównie makrofagi alveolarne (AM). Znacznie mniej wiadomo o makrofagach bronchialnych (BM) i ich subpopulacjach. Indukowana płwocina jest łatwo dostępną i wartościową próbką, która odzwierciedla głównie profil komórkowy makrofagów zlokalizowanych w tchawicy oraz oskrzelach dużych i średnich (BM). Celem pracy była charakterystyka cech molekularnych makrofagów z płwociny indukowanej od pacjentów z astmą i POChP. Z odseparowanych z płwociny makrofagów wyizolowaliśmy RNA i przeprowadziliśmy analizę transkryptomową. Nasze badanie wykazało, że makrofagi od chorych na astmę, POChP i grupy kontrolnej charakteryzują się innym profilem ekspresji genów. Znaleźliśmy powiązanie między profilem ekspresji genów a ruchliwością komórek, rzęskami, połączeniami komórkowymi i organizacją adhezji, co sugeruje związek funkcji makrofagów z tymi procesami biologicznymi w patofizjologii obturacyjnych chorób płuc.

- Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Młacki M, Górską K, Krenke R. Epithelial-macrophage-dendritic cell interactions impact alarmins expression in asthma and COPD. *Clin Immunol.* 2020; 215:108421 IF 3,37

W układzie oddechowym makrofagi i komórki dendrytyczne współpracują, jako pierwsza linia obrony przed patogenami i antygenami cząstek stałych. W badaniu zastosowano model wspólnej hodowli trzech rodzajów komórek, wykorzystujący komórki nabłonka nosa, wraz z: makrofagami pochodzącymi z monocytów (moMφs) i komórkami dendrytycznymi pochodzącymi z monocytów (moDCs). Komórki te ściśle współpracują w tworzeniu przelnabłonkowej oddziałującej sieci komórkowej. Sieć wspomagana jest przez nabłonek dróg oddechowych, który jest nie tylko pasywną barierą anatomiczną, ale także strukturą immunologiczną wydzielającą peptydy przeciwdrobnoustrojowe, cytokiny i reaktywne formy tlenu. Biorąc pod uwagę znaczną lukę w wiedzy na temat wpływu TSLP, IL-33 i IL-25 na strukturalne/immunologiczne interakcje komórek w astmie i POChP, opracowaliśmy model *in vitro* do oceny cech funkcjonalnych tych cytokin w obturacyjnych

chorobach płuc. Celem badania była ocena wpływu interakcji między makrofagami, nabłonkiem dróg oddechowych i komórkami dendrytycznymi na ekspresję TSLP, IL-33 i IL-25 w astmie, POChP i u zdrowych ochotników oraz ocena wpływu stymulacji proalergiczej (IL-13) i imitującej wirusy (poli I:C) na ekspresję TSLP, IL-33 i IL-25 w kulturach komórkowych złożonych z komórek nabłonka, makrofagów i komórek dendrytycznych. Nasze badanie wykazało różne wzorce ekspresji TSLP i IL-33 w nabłonku dróg oddechowych u osób zdrowych, chorych na astmę i POChP. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie wykazujące, że interakcje między makrofagami, komórkami dendrytycznymi i nabłonkowymi mogą znacząco wpływać na wydzielanie TSLP i IL-33 przez nabłonek nosa. W grupie chorych na POChP oraz u zdrowych stosunkowo wysoki poziom ekspresji TSLP w monokulturach nabłonka nie ulegał zmianie, gdy komórki hodowano wspólnie z makrofagami i komórkami dendrytycznymi, jako współhodowle. W astmie ekspresja TSLP znacznie wzrastała po dodaniu makrofagów i komórek dendrytycznych do hodowli nabłonka. Znaleźliśmy również różne wzorce odpowiedzi na stymulację IL-13 i poli I:C w różnych współhodowle od pacjentów z astmą, POChP i grupą kontrolną. Różnice te mogą być, przynajmniej częściowo, związane z różną proporcją fenotypów komórek nabłonkowych występujących w hodowlach z trzech grup badanych. Niezależnie od odsetka różnych fenotypów komórek nabłonkowych w hodowlach wielowarstwowych pochodzących od pacjentów z astmą, POChP i osób zdrowych, nabłonek astmatyków wykazywał wyższą ekspresję receptorów dla TSLP, IL-25 i IL-33 niż zdrowy nabłonek. To odkrycie dotyczyło wszystkich fenotypów komórek, w tym wydzielniczych, rzęskowych i podstawnych komórek nabłonka. Nasze badanie wykazało, że na ekspresję cytokin nabłonkowych może mieć wpływ interakcja pomiędzy komórkami układu immunologicznego i komórkami strukturalnymi w drogach oddechowych. Wyniki naszej pracy wykazały, że TSLP może być związany z komórkami sekrecyjnymi nabłonka, podczas gdy IL-33 z komórkami rzęskowymi. Wierzymy, że wyniki tego projektu pomogą lepiej zrozumieć patofizjologię astmy i POChP oraz dokładniej wyjaśnić podstawowe procesy, które napędzają te choroby.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

a) Projekty naukowe realizowane we współpracy z inną uczelnią

1. Tytuł projektu: Badanie aparatu fotosyntetycznego roślin wyższych. Miejsce realizacji: Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski. Finansowanie ze środków własnych UW.
 - Garstka M, **Nejman P**, Rosiak M. The action of oxygen on chlorophyll fluorescence quenching and absorption spectra in pea thylakoid membranes under the steady-state conditions. *J. Photochem. Photobiol. B* 2004;77:79–92
2. Wykonawca projektu: „Oddziaływanie nanostruktur węglowych na układ oddechowy w warunkach *in vivo*”; nr grantu KBN 3 PO5A 126 22, czas realizacji 2002-2003, miejsce realizacji: Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski oraz Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny
 - Huczko A, Lange H, Sioda M, Bystrzejewski M, **Nejman P**, Grubek-Jaworska H, Czumińska K, Glapiński J. Pathogenic activity of 1D nanocarbons: *in vivo* studies on guinea pigs; 2004; *Electronic Properties of Synthetic Nanostructure*, ed.. Kuzmany et al. American Institute of Physics

- Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Grubek-Jaworska H, **Nejman P**, Przybyłowski T, Czumińska K, Glapiński J, Walton DWR, Kroto H. Pulmonary Toxicity of 1-D nanocarbons materials. *Fuller Nanotub.* 2005;13:141–145
 - Grubek-Jaworska H, **Nejman P**, Czumińska K, Przybyłowski T, Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Chazan R. Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon.* 2006;44:1057–1063
3. Kierownik projektu: „Poszukiwanie immunologicznych markerów korelujących z nadreaktywnością oskrzeli w obturacyjnych chorobach płuc”. Projekt został wyłoniony, jako laureat I edycji konkursu „Celuj w innowacje” organizowanego przez Celon Pharma S.A. i otrzymał dofinansowanie na realizację badań. Czas realizacji projektu 2013-2015, miejsce realizacji: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny
- Górska K, **Nejman-Gryz P (autor korespondujący)**, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Comparison of Thymic Stromal Lymphopoietin Concentration in Various Human Biospecimens from Asthma and COPD Patients Measured with Two Different ELISA Kits. *Adv Exp Med Biol.* 2017;955:19-27
 - Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Górska K, Białek-Gosk K, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. Expression of Inflammatory Mediators in Induced Sputum: Comparative Study in Asthma and COPD. *Adv Exp Med Biol.* 2016;1–13
 - Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Górska K, Białek-Gosk K, Hermanowicz-Salamon J, Krenke R. The correlation between expression of selected inflammatory mediators in induced sputum and respiratory tests in asthma and COPD. 25th ERS Annual Congress, Amsterdam, Netherlands September 26-30, 2015.
 - **Nejman-Gryz P**, Górska K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M. Periostin and TSLP: New markers useful in diagnosis of obstructive lung disease. 25th ERS Annual Congress, Amsterdam, Netherlands September 26-30, 2015.
 - **Nejman-Gryz P**, Górska K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. TSLP as a potent activator of Th2 response in obstructive lung diseases. 26th ERS Annual Congress Londyn, England September 3-7, 2016
- b) Publikacje powstałe w ramach projektów realizowanych we współpracy z innymi uczelniami:
- Garstka M, Nejman P, Rosiak M. The action of oxygen on chlorophyll fluorescence quenching and absorption spectra in pea thylakoid membranes under the steady-state conditions. *J. Photochem. Photobiol. B* 2004;77:79–92
Współpraca z Wydziałem Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
 - Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Grubek-Jaworska H, Nejman P, Przybyłowski T, Czumińska K, Glapiński J, Walton DWR, Kroto H. Pulmonary Toxicity of 1-D nanocarbons materials. *Fuller.Nanotub.* 2005;13:141–145
Współpraca z: Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
Wydziałem Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
Instytutem Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk oraz Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego
School of Life Science University of Sussex Brighton UK

- Grubek-Jaworska H, **Nejman P**, Czumińska K, Przybyłowski T, Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski P, Chazan R. Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon* 2006;44:1057–1063
Współpraca z: Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
Wydziałem Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
- **Nejman-Gryz P**, Grubek-Jaworska H, Glapiński J, Hoser G, Chazan R. Effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on lung resistance and inflammatory reaction in experimental asthma. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006;57 Suppl 4:229–239
Współpraca z: Instytutem Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN
Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego
- Górska K, Maskey-Warzęchowska M, **Nejman-Gryz P**, Korczyński P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative study of periostin expression in different respiratory samples in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2016;126:124–137
Współpraca z Narodowym Instytutem Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie
- Górska K, **Nejman-Gryz P (corresponding author)**, Paplińska-Goryca M, Korczyński P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative Study of IL-33 and IL-6 Levels in Different Respiratory Samples in Mild-to-Moderate Asthma and COPD. *COPD*.2018;15:36-45
Współpraca z Narodowym Instytutem Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie
- Paplińska-Goryca M, Goryca K, Misiukiewicz P, **Nejman-Gryz P**, Górska K, Krenke R. Genetic characterization of macrophages from induced sputum of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Intern Med.* 2018;128:559-562
Współpraca z: Zakładem Genetyki Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie
Wydziałem Ogrodnictwa i Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- Paplińska-Goryca M, Goryca K, Misiukiewicz-Stępień P, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Górska K, Maskey-Warzęchowska M, Krenke R. mRNA expression profile of bronchoalveolar lavage fluid cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 2019;49:1-8
Współpraca z Zakładem Genetyki Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie
- Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Młacki M, Górska K, Krenke R. Epithelial-macrophage-dendritic cell interactions impact alarmins expression in asthma and COPD. *Clin Immunol.* 2020;215:108421
Współpraca z OncoArendi Therapeutics S.A.
- Krejner-Bienias A, Grzela K, Krenke R, Górska K, **Nejman-Gryz P**, Stadnik D, Kobyłska E, Grzela T. Is the composition of exhaled breath condensate a key to explain the course of COVID-19 in children? *Postepy Dermatol Alergol.* 2020
Współpraca z Instytutem Biotechnologii Sieci Badawczej Łukasiewicz w Warszawie

- Papińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P (corresponding author)**, Proboszcz M, Kwiecień I, Hermanowicz-Salamon J, Grabczak EM, Krenke R. Expression of TSLP and IL-33 receptors on sputum macrophages of asthma patients and healthy subjects. *J Asthma*. 2020;57(1):1-10
Współpraca z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Hematologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie
- Papińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, Proboszcz M, **Nejman-Gryz P**, Górka K, Zajusz-Zubek E, Krenke R. Interactions of nasal epithelium with macrophages and dendritic cells variously alter urban PM-induced inflammation in healthy, asthma and COPD. *Sci Rep*. 2021;1:13259
Współpraca z Wydziałem Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej

c) Pozostałe granty naukowe:

1. Wykonawca projektu: „Ocena przydatności molekularnej metody identyfikacji gatunku prątków, GenoType Mycobacterium CM/AS (HAIN, Germany) do różnicowej diagnostyki gruźlicy i mykobakterioz”; nr grantu MNSzW 0630/R/1/PO1/07/02, czas realizacji 2007-2008, miejsce realizacji: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny
 - Safianowska A, Walkiewicz R, **Nejman-Gryz P**, Chazan R, Grubek-Jaworska H. Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifesciences, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria. *Pneumonol Alergol Pol*. 2009;77:517–520.
 - Safianowska A, Walkiewicz R, **Nejman-Gryz P**, Chazan R, Grubek-Jaworska H. The comparison between two methods for typing of nontuberculous mycobacteria: high pressure liquid chromatography and molecular assay GenoType Mycobacterium CM/AS. *Pneumonol Alergol Pol*. 2010;78:363–368
 - Safianowska A, Walkiewicz R, **Nejman-Gryz P**, Grubek-Jaworska H. Two selected commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol*. 2012;80:6–12.
2. Wykonawca projektu: „The relationship between the expression of eotaxin (CCL11, CCL24, CCL26) in the mucosa of the nose and airways eosinophilia during certain allergic and non-allergic diseases of the lung”; nr grantu NCN 402 417 338, czas realizacji 2010-2013, miejsce realizacji: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny
 - Papińska M, Hermanowicz-Salamon J, **Nejman-Gryz P**, Białek-Gosk K, Rubinsztajn R, Arcimowicz M, et al. Expression of eotaxins in the material from nasal brushing in asthma, allergic rhinitis, and COPD patients. *Cytokine*. 2012;60:393–9
 - Papińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Chazan R, Grubek-Jaworska H. The expression of the eotaxins IL-6 and CXCL8 in human epithelial cells from various levels of the respiratory tract. *Cell. Mol. Biol. Lett*. 2013;18:612–630
3. Wykonawca projektu: “Participation of TSLP, IL-33 and IL-25 in the interactions between respiratory epithelial cells, dendritic cells and macrophages in obstructive respiratory diseases”; nr grantu NCN 2016/23/D/NZ5/03279, czas realizacji 2017-2021, miejsce realizacji: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny

- Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, Proboszcz M, **Nejman-Gryz P**, Górską K, Krenke R. The Expressions of TSLP, IL-33, and IL-17A in Monocyte Derived Dendritic Cells from Asthma and COPD Patients are Related to Epithelial-Macrophage Interactions. *Cells*. 2020;9(9):1944
 - Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Młacki M, Górską K, Krenke R. Epithelial-macrophage-dendritic cell interactions impact alarmins expression in asthma and COPD. *Clin Immunol*. 2020;215:108421
4. Wykonawca zadań badawczych w ramach umowy z przemysłem z firmą OncoArendi dofinansowanie z NCBiR pt. „Opracowanie kandydata na lek „*first in class*” w terapii idiopatycznego włóknienia płuc w oparciu o substancje czynne blokujące chitotriozydazę”. Czas realizacji 2015-2019, miejsce realizacji: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawski Uniwersytet Medyczny
- Dymek B, Sklepkiewicz P, Młacki M, Zagożdżon A, Koralewski R, Mazur M, Paplińska-Goryca M, Nejman-Gryz P, Proboszcz M, Górską K, Maskey-Warzęchowska M, Przysucha N, Krenke R, Dobrzański P, Gołębiowski A, Dzwonek K OATD-01, a Dual Chitinase Inhibitor, Significantly Ameliorates Pulmonary Fibrosis in the Bleomycin-Induced Mouse Model. International Conference of the American-Thoracic-Society San Diego, USA May 18-23, 2018
 - Dymek B, Sklepkiewicz P, Młacki M, Zagożdżon A, Koralewski R, Mazur M, Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Górską K, Maskey-Warzęchowska M, Przysucha N, Krenke R, Dobrzański P, Gołębiowski A, Dzwonek K. CHIT1 is a novel therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): anti-fibrotic efficacy of OATD-01, a potent and selective chitinase inhibitor in the mouse model of pulmonary fibrosis. 28th ERS Annual Congress Paris, France September 15-19, 2018
 - Dyjas R, Lipner J, Dymek B, Młacki M, Zagożdżon A, Lipińska A, Paplińska-Goryca M, **Nejman-Gryz P**, Proboszcz M, Maskey-Warzęchowska M, Górską K, Przysucha N, Krenke R, Dobrzański P, Dzwonek K, Pikul S. Clinical Development of OATD-01 - a Novel, Chitinase Inhibitor for Treatment of Interstitial Lung Diseases. ATS International Conference May 2019

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

- nauczanie studentów I i II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w zakresie chorób płuc od 2011 roku (prowadzenie seminariów, zajęć praktycznych i zajęć w pracowniach)
- prowadzenie zajęć fakultatywnych dla studentów kierunku lekarskiego I Wydziału Lekarskiego w latach
- współpraca ze studentami ze Studenckiego Koła Naukowego „Alveolus” działającego przy Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii WUM w zakresie pracy naukowej, która zaowocowała doniesieniami zjazdowymi oraz publikacjami naukowymi. Jedno z powstałych doniesień zajęło 1-sze miejsce na konferencji: 21st Century Medicine International Medical Congress for Students and Young Doctors. Orzołek I, Nejman-Gryz P, Paplińska-Goryca M. Expression of IL17RA receptor on sputum macrophages of asthma patients. 21st Century Medicine International Medical Congress for Students and Young Doctors March 2021, Lublin, Poland

- autorstwo rozdziałów w skryptach dla studentów dotyczących diagnostyki laboratoryjnej w chorobach układu oddechowego.
Safianowska A, Nejman-Gryz P. Tytuł rozdziału: Badania mikrobiologiczne. Standardy diagnostyczno-terapeutyczne w chorobach układu oddechowego – wskazówki praktyczne. Wydawnictwo Medyczne „Alfa Medica Press”, 2015, 2018
- autorstwo rozdziałów w monografiach naukowych dotyczących badań mikrobiologicznych układu oddechowego.
Nejman-Gryz P, Paplińska-Goryca M. Tytuł rozdziału: Diagnostyka laboratoryjna w chorobach układu oddechowego. Pneumologia Tom 2 Badania diagnostyczne i leczenie. Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2014, 2017
- prowadzenie wykładów szkoleniowo-dydaktycznych dla lekarzy w ramach specjalizacji z chorób płuc oraz z specjalizacji z alergologii
- prezentacje na konferencjach krajowych i zagranicznych

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia

- XII.2007 Nagroda zespołowa naukowa pierwszego stopnia, Rektora Akademii Medycznej w Warszawie, za cykl prac poznawczych w zakresie patologii układu oddechowego
- X.2015 Nagroda zespołowa naukowa pierwszego stopnia, Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za dwutomową monografię: „Pneumologia - wybrane jednostki chorobowe” i „Pneumologia – badania diagnostyczne i leczenie”
- VI.2016 Nagroda zespołowa naukowa za monografię „Standardy diagnostyczno-terapeutyczne w chorobach układu oddechowego- wskazówki praktyczne”
- XI.2021 Nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za publikację: **Nejman-Gryz P, Górka K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R.** Periostin and Thymic Stromal Lymphopoietin—Potential Crosstalk in Obstructive Airway Diseases. *J Clin Med.* 2020;9(11):3667

Przynależność do towarzystw naukowych

- Polskie Towarzystwo Chorób Płuc – Oddział Warszawsko-Otwocki
- Polskie Towarzystwo Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej
- European Respiratory Society

Recenzent publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

- International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease
- Journal of Asthma and Allergy
- Journal of International Medical Research

- Mediators of Inflammation
- Journal of Inflammation Research
- Journal of Clinical Laboratory Analysis
- Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology