

**mgr inż. Paulina Misiukiewicz-Stępień**

**Wpływ pyłu zawieszonego w powietrzu na nabłonek  
oddechowy w interakcjach pomiędzy nabłonkiem, komórkami  
dendrytycznymi i makrofagami w obturacyjnych chorobach  
płuc**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Paplińska-Goryca

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022

## 2. Streszczenie w j. polskim

Zanieczyszczenie środowiska, takie jak podwyższone stężenie pyłu zawieszonego w powietrzu, jest ważnym elementem wpływającym na zdrowie publiczne. Fizjologiczna organizacja nabłonka odgrywa kluczową rolę w tworzeniu bariery dróg oddechowych. Interakcje komórek strukturalnych z komórkami immunologicznymi rezydującymi w drogach oddechowych (makrofagami i komórkami dendrytycznymi), inicjują miejscową odpowiedź immunologiczną. Astma i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) są jednymi z najczęściej występujących, przewlekłych chorób układu oddechowego, które charakteryzują się zwiększonym napływem komórek układu immunologicznego do płuc w toku przebiegającej reakcji zapalnej. W konsekwencji, proces ten przyczynia się do podwyższonego uwalniania mediatorów w miejscu zapalenia i może prowadzić do uruchomienia lokalnych mechanizmów naprawczych, przebudowy nabłonka, osłabienia jego funkcji, a także zwiększonej produkcji śluzowej wydzieliny. Przewlekły stan zapalny w drogach oddechowych wpływa na powstanie objawów choroby m.in. duszność (spoczynkową lub wysiłkową), kaszel czy obniżoną czynność płuc.

Pył o średnicy aerodynamicznej cząstek do 10  $\mu\text{m}$ , ( $\text{PM}_{10}$ ) stanowi mieszaninę cząstek frakcji  $\text{PM}_{2,5}$ , o średnicy aerodynamicznej do 2,5  $\mu\text{m}$ , oraz dodatkowych, większych i bardziej zróżnicowanych składników. W związku z tym charakteryzuje się odmiennym od wyizolowanej frakcji  $\text{PM}_{2,5}$  składem chemicznym i działaniem toksycznym. Do najważniejszych mechanizmów negatywnego oddziaływania pyłu  $\text{PM}_{10}$  na nabłonek dróg oddechowych zaliczane są: modulacja odporności wrodzonej, odpowiedzi zapalnej oraz indukcja stresu oksydacyjnego, których przebieg i natężenie zależne są od składu chemicznego pyłu z zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. Ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza, w tym  $\text{PM}_{10}$ , wykazuje negatywny miejscowy wpływ na nabłonek oddechowy, moduluje oddziaływanie międzykomórkowe i powoduje osłabienie zdolności obronnych organizmu, a to z kolei może prowadzić do zaostrzeń i progresji obturacyjnych chorób układu oddechowego.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy polegały na określeniu zmian zachodzących w nabłonku z jamy nosa w odpowiedzi na stymulację pyłem  $\text{PM}_{10}$  z obszarów miejskich. Analizę przeprowadzono na poziomie molekularnym, biochemicznym i strukturalnym, a wykorzystane komórki nabłonka zostały pobrane od chorych na astmę, POChP oraz osób zdrowych. Wyróżniono następujące cele pracy

(1) przegląd światowej literatury charakteryzującej wpływ pyłu PM<sub>10</sub> na fizjologię nabłonka dróg oddechowych w astmie i POChP, (2) analiza i porównanie wpływu ekspozycji na pył PM<sub>10</sub> na odpowiedź zapalną nabłonka z jamy nosa od chorych na astmę lub POChP i osób zdrowych z wykorzystaniem mono- i wielowarstwowego modelu *in vitro*, (3) określenie integralności nabłonka dróg oddechowych oraz ekspresji markerów remodelingu w odpowiedzi na stymulację PM<sub>10</sub> w nabłonku osób zdrowych, chorych na astmę lub POChP, (4) analiza transkryptomyczna odpowiedzi nabłonka z jamy nosowej od chorych na obturacyjne choroby płuc i osób zdrowych, współhodowanego z makrofagami i komórkami dendrytycznymi po ekspozycji na PM<sub>10</sub>.

Metodyka badania obejmowała rekrutację chorych na astmę, POChP oraz zdrowych ochotników, izolację komórek nabłonka jamy nosa pozyskanego z wymazu szczoteczki błony śluzowej nosa oraz izolację i specjalizację makrofagów oraz komórek dendrytycznych z monocytów krwi obwodowej. W badaniach wykorzystano hodowle wielokomórkowe w których komórki od dawcy (makrofagi, nabłonek, komórki dendrytyczne) stanowiły spójny, indywidualny model doświadczalny. Hodowle poddawano 24-godzinnej ekspozycji na PM<sub>10</sub> o stężeniu 100 µg/ml. Komórki nabłonka hodowano na granicy faz powietrze-ciecz (*air-liquid interface*, ALI) w wyniku czego uzyskano hodowlę składającą się z wielu typów wyspecjalizowanych komórek nabłonkowych, w tym komórek podstawnych, urzęsionych i wydzielniczych. Komórki dendrytyczne oraz makrofagi uzyskane z monocytów krwi obwodowej (*monocyte derived dendritic cells*, moDC; *monocyte derived macrophages*, moMφ) stanowiły odpowiednik komórek immunologicznych napływających do dróg oddechowych. Zastosowany model badawczy pozwolił na określenie wpływu frakcji PM<sub>10</sub> na nabłonek dróg oddechowych, z uwzględnieniem wpływu prostych interakcji międzykomórkowych, które modulują tkankową odpowiedź immunologiczną. Dodatkowo, wykorzystanie wielkoskalowej analizy, tj. badania transkryptomu, pozwoliło na kompleksową ocenę różnorodności mechanizmów odpowiedzialnych za procesy patofizjologiczne po ekspozycji na zanieczyszczenia powietrza w obturacyjnych chorobach płuc. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń oraz analiz zostały przedstawione w formie opublikowanych artykułów stanowiących poszczególne rozdziały pracy doktorskiej.

Przeгляд literatury światowej pozwolił dokonać szerokiej analizy opublikowanych wyników badań dotyczących negatywnego działania frakcji PM<sub>10</sub> i jej istotnego wpływu na powstawanie choroby oraz zaostrzeń objawów u chorych na astmę i POChP. Najistotniejsze wyniki badań własnych wskazały, że nabłonek dróg oddechowych osób

z obturacyjnymi chorobami płuc, a w szczególności chorych na POChP, charakteryzuje się najsilniejszą odpowiedzią prozapalną po ekspozycji na PM<sub>10</sub>. Stymulacja PM<sub>10</sub> zwiększała ekspresję IL-6 i IL-8 w nabłonku współhodowanym z komórkami dendrytycznymi i makrofagami w porównaniu do hodowli mononabłonkowych, co wskazuje na istotną rolę komórek napływowych w miejscowej odpowiedzi zapalnej dróg oddechowych. 24-godzinna ekspozycja na pył PM<sub>10</sub> nie spowodowała zmian integralności połączeń międzykomórkowych w nabłonku we wszystkich analizowanych grupach, jednak wpłynęła na ekspresję EGFR i ST2 na nabłonku astmatycznym. Wyniki analizy transkryptomicznej nabłonka dróg oddechowych wskazują na odmienny niż u osób zdrowych charakter miejscowej odpowiedzi biologicznej w chorobach obturacyjnych po ekspozycji na miejski pył zawieszony. W zastosowanym przez nas modelu *in vitro* stymulacja pyłem PM<sub>10</sub> u osób z chorobami obturacyjnymi wzmacniała ekspresję mRNA genów odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną, w szczególności napływ leukocytów, dodatkowo w astmie zwiększała ekspresję mRNA genów związanych z procesami przebudowy komórek strukturalnych, natomiast w POChP modulowała odpowiedź na stres oksydacyjny. U osób zdrowych, ekspozycja na PM<sub>10</sub> aktywowała ścieżki związane z procesami regeneracyjnymi w komórkach nabłonkowych.