

**RECENZJA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH**

**LEK. ALICJI KREJNER- BIENIAS NA TEMAT :**

**„WPLYW KONDENSATÓW WYDYCHANEGO POWIETRZA NA WYBRANE  
TYPY KOMÓREK HODOWANE „IN VITRO”.**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa autorstwa lekarza Alicji Krejner- Bienias jest opracowaniem trzech publikacji stanowiących wspólny cykl tematyczny .

**Publikacja I :** „ Influence of exhaled breath condensates from children with asthma on endothelial cells cultured *in vitro* . Do we really know everything about our breath condensate?”

**Krejner-Bienias A, Grzela K, Zagórska W, Chojnowska M, Świrska M, Grzela T,**

Adv Dermatol Allergol 2019, impact factor: 1.757, punkty MNiSW: 70, IC : 168,83; przyjęta do druku.

**Publikacja II :** “ Wpływ kondensatów wydychanego powietrza , zebranych od dzieci chorych na astmę i od dzieci zdrowych, na hodowle *in vitro* wybranych linii komórkowych” ,

**Krejner-Bienias A, Grzela K, Zagórska W, Chojnowska M, Grzela T; Alergologia i Immunologia Współczesna 2019, przyjęta do druku.**

**Publikacja III:** „ Exhaled breath condensates from healthy children induce cell death of *in vitro* cultured cells by activation of apoptosis”.

**Krejner-Bienias A, Grzela K, Zagórska W, Chojnowska M, Grzela T; Adv Dermatol Allergol 2019, impact factor: 1.757, punkty MNiSW: 70, IC : 168,83; przyjęta do druku.**

Wszystkie prace zostały przyjęte do druku w recenzowanych czasopismach.

Łączny IF : 3.514, łączna liczba punktów MNiSW : 140, łączny IC: 337,66.

Forma przedstawienia rozprawy doktorskiej na bazie wcześniej opublikowanych prac jest stosunkowo nowym, ale bardzo dobrym rozwiązaniem. Tak przygotowana rozprawa doktorska jest bardzo wartościowa i zasługuje na uznanie, a wcześniejsze opublikowanie wyników jest formą weryfikacji ich poziomu naukowego. Fakt ten po części zwalnia mnie z obowiązku szczegółowej analizy metodyki i wyników przedstawionego do oceny cyklu.

Opracowanie liczy łącznie 51 stron, w tym: stronę tytułową, spis treści, wykaz skrótów, streszczenie pracy w języku polskim, streszczenie pracy w języku angielskim, wstęp, omówienie wpływu kondensatów wydychanego powietrza na komórki śródbłonna, omówienie wpływu kondensatów na inne typy komórek, omówienie badań czynników regulujących apoptozę indukowaną przez kondensaty, obserwacje i wnioski, bibliografię (16 pozycji) oraz 3 publikacje.

Badania przeprowadzone przez Autorkę dotyczą bardzo ważnego problemu diagnostycznego i terapeutycznego jakim jest astma u dzieci. Astma to przewlekła choroba zapalna dróg oddechowych prowadząca do patologicznej przebudowy ściany oskrzeli. Uważa się, że za kontrolę tego procesu odpowiadają między innymi cytokiny i chemokiny prozapalne których obecność można monitorować badając kondensat wydychanego powietrza. Jest to bezpieczna, nieinwazyjna metoda która może być wykonywana nawet u małych dzieci.

Wcześniejsze badania przeprowadzone przez zespół którego członkiem jest Autorka wykazały, że kondensaty pozyskiwane od dzieci chorych na astmę zawierały, w odróżnieniu od kondensatów pochodzących od dzieci zdrowych, szereg czynników regulujących proces angiogenezy. Sprawą do rozwiązania została dalsza ocena różnic pomiędzy składem tych kondensatów oraz przebadanie ich aktywności biologicznej w hodowlach tkankowych *in vitro*.

Zagadnieniom tym poświęcona jest praca doktorska lekarz Alicji Krejner-Bienias.

Uważam, że temat który podjęła, posiada duże znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Autorka na wstępie (łącznie ze wstępami trzech załączonych prac) dokładnie, wyczerpująco i ściśle na temat omówiła współczesny stan wiedzy dotyczący opracowywanego przez siebie zagadnienia, wykazując dużą erudycję. W kolejnych rozdziałach Autorka opisuje przesłanki do podjęcia badań a także kolejne cele pracy oraz założenia i plan badań. Celem badań przedstawionych w pierwszej pracy z cyklu była ocena wpływu kondensatów na komórki śródbłonna. Stwierdzono że kondensaty pochodzące od dzieci z łagodną astmą wywierały niewielki wpływ na aktywność metaboliczną i żywotność komórek śródbłonna, w przeciwieństwie do kondensatów z grupy kontrolnej, dających silny efekt cytotoksyczny, gatunkowo nieswoisty. Półilościowa analiza obecności 105 kluczowych cytokin immunoregulacyjnych i prozapalnych, wykonana przy użyciu mikromacierzy białkowych, nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami.

Celem badań opisanych w drugiej pracy z cyklu była ocena wpływu kondensatów na inne typy komórek (ludzkie fibroblasty izolowane z tkanki płucnej i ludzka linia keratynocytarna) oraz próba ustalenia czynnika odpowiedzialnego za wystąpienie badanego zjawiska. Efekty były podobne jak w hodowlach komórek śródbłonna. Analizą przeprowadzoną metodą spektrometrii masowej wytypowano dwa białka, hornerynę i białko BPIFA1, które potencjalnie mogły by odpowiadać za cytotoksyczne właściwości kondensatów. Horneryna to białko z rodziny S100, pierwotnie identyfikowane jako jeden z markerów różnicowania keratynocytów. Ulega zwiększonej ekspresji m.in. podczas gojenia ran oraz w skórze pacjentów z łuszczycą, występuje także w wielu rodzajach nowotworów złośliwych oraz w komórkach śródbłonna ich naczyń. Dokładna rola horneryny wciąż pozostaje nieznana. Prawdopodobnie bierze udział w regulacji procesu zapalnego i w powstawaniu przerzutów,

na co może wskazywać związek jej zwiększonej ekspresji z gorszym rokowaniem dla pacjenta.

Jeszcze ciekawsze wydają się właściwości drugiego z wytypowanych czynników, BPIFA1, i jego możliwy udział w obserwowanym zjawisku cytotoksyczności EBC. Białko BPIFA1 (bactericidal/permeability-increasing fold containing family A member 1), znane również jako PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone), jest ważnym składnikiem mechanizmów odporności nieswoistej, odpowiadając za neutralizację różnych patogenów, m.in. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, jak również wirusów grypy typu A, czy RSV (respiratory syncytial virus). Wydzielane jest głównie przez nabłonek górnych dróg oddechowych, stanowiąc blisko 1% wszystkich białek zawartych w warstwie płynu, pokrywającego powierzchnię błony śluzowej dróg oddechowych. Stwierdzono, że stężenie BPIFA1 jest obniżone w popłuczynach z nosa u osób narażonych na drażniące działanie dymu tytoniowego, wykazując przy tym korelację z wyższym ryzykiem nawracających zapaleń górnych dróg oddechowych, w tym zapalenia ucha środkowego oraz zapalenia błony śluzowej nosa i zatok przynosowych. Podobnie, niskie stężenie tego białka w biopsjach błony śluzowej nosogardła stwierdzono u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa oraz z przewlekłymi procesami zapalnymi przyzębia.

Wiadomo, że jednym z mechanizmów działania BPIFA1 jest blokowanie nabłonkowych kanałów sodowych (epithelial sodium channel, ENaC). Wykazano, że w komórkach śródbłonna zablokowanie ENaC może powodować obrzęk i usztywnienie błony komórkowej. Możliwe zatem, że wczesne (po 2-3 godz.) zmiany morfologiczne, m.in. obrzmienie i wakuolizacja cytoplazmy, obserwowane w hodowlach komórek poddanych działaniu EBC z grupy kontrolnej, są wynikiem zablokowania ENaC przez białko BPIFA1, które jest obecne w tych kondensatach. Tym samym, brak takiego efektu w hodowlach poddanych działaniu EBC

od pacjentów z astmą można by wyjaśnić znacznie niższym poziomem BPIFA1 w tych próbkach.

W trzeciej pracy cyklu Autorka badała czynniki regulujące apoptozę indukowaną przez kondensaty . Wykazała, że : A) komórki hodowane *in vitro* w obecności kondensatów od dzieci zdrowych wykazywały zmiany morfologiczne i metaboliczne typowe dla zjawiska apoptozy;

B) Cytotoksyczność indukowana przez te kondensaty prawdopodobnie jest zależna od aktywacji alternatywnego szlaku apoptozy w komórce;

C) Analiza profilu wybranych białek , regulujących apoptozę indukowaną przez te kondensaty sugeruje, że proces ten , przynajmniej częściowo może być kontrolowany przez białko Hsp27;

D) Badanie próbek kondensatów metodą spektrometrii masowej nie pozwoliło na jednoznaczną identyfikację czynników odpowiedzialnych za ich efekt cytotoksyczny.

Wytypowano dwa potencjalne czynniki, które zostaną poddane dalszym badaniom.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka sformułowała następujące wnioski ogólne:

1. Kondensaty dzieci zdrowych zawierają czynnik lub czynniki, wykazujące *in vitro* aktywność cytotoksyczną wobec badanych komórek. Wydaje się prawdopodobne, że w przypadku kondensatów od pacjentów z astmą brak takiego efektu wynika z faktu, że czynnik ten nie jest w tych kondensatach obecny w ogóle lub występuje w znacznie mniejszej ilości, niż w kondensatach od dzieci zdrowych. Możliwe również, że w kondensatach od pacjentów z astmą ewentualne cytotoksyczne działanie postulowanego czynnika może być kompensowane przez obecność regulatorów angiogenezy.

2. Biologiczne znaczenie takiego czynnika mogłoby polegać na hamowaniu nadmiernej proliferacji komórek prawidłowej błony śluzowej dróg oddechowych. Taka negatywna regulacja może być ważnym mechanizmem kontroli immunologicznej, w tym również przeciwnowotworowej. Brak hamującego efektu w przypadku astmy mógłby sprzyjać procesom niekontrolowanej, patologicznej przebudowy, tj. remodelingu ściany oskrzeli, prowadząc do ich nieodwracalnej obturacji.
3. Wyjaśnienie opisywanego zjawiska, tj. identyfikacja czynnika je wywołującego i mechanizmów odpowiedzialnych za jego występowanie mogą mieć potencjalne zastosowanie praktyczne w profilaktyce i leczeniu chorób układu oddechowego, dlatego niezbędne są dalsze badania nad tym zagadnieniem.

Oceniając całość dostarczonych materiałów stwierdzam, że Autorka wyczerpująco, starannie i przejrzyście opisała wykorzystane w pracy materiały oraz stosowane metody. Zastosowane metody są nowoczesne, prawidłowe i świadczą o dobrej znajomości literatury tych zagadnień oraz umiejętności planowania i przeprowadzania badań. Dyskusja uzyskanych wyników na tle piśmiennictwa jest prowadzona jasno, logicznie i ostrożnie, co świadczy o dużej erudycji i dojrzałości naukowej Autorki.

Na zakończenie, pragnę jeszcze raz podkreślić, że przedstawiona praca doktorska dotyczy tematu o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym. Na podstawie powyższej oceny oraz oświadczeń współautorów prac stwierdzam, że cykl prac pod łącznym tytułem „Wpływ kondensatów wydychanego powietrza na wybrane typy komórek hodowane „*in vitro*” jest oryginalnym osiągnięciem naukowym Autorki, która wykazała bardzo dobrą znajomość tematu i opanowanie trudnych metod badawczych. Rozprawa doktorska lek. Alicji Krejner-Bienias spełnia wszelkie kryteria wymagane przez Ustawę od tego rodzaju prac. Stawiam wniosek o jej przyjęcie z wyróżnieniem i o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof.dr hab. n.med. Ewa Skopińska-Różewska

Warszawa, 28 sierpnia 2019 roku

*Ewa Skopińska-Różewska*  
Prof. dr hab. Ewa Skopińska-Różewska  
immunolog  
02-777 Warszawa, ul. Rejzla 61/B m.12  
nr um. NFZ: 980765131  
nr wyk. zaw. 1744301

### Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie

pracy doktorskiej lek. med. Alicji Krejner-Bienias p.t. „Wpływ kondensatów wydychanego powietrza na wybrane typy komórek hodowane „*in vitro*”

1. Praca dotyczy tematu ważnego zarówno z punktu widzenia teoretycznego jak i praktycznego
2. Dobór materiałów i metod badawczych został dokonany wzorowo
3. Autorka opanowała szereg trudnych metod badawczych , które w sposób właściwy zastosowała w badaniach będących tematem pracy doktorskiej
4. Autorka uzyskała szereg interesujących wyników , ściśle odpowiadających na pytania postawione przed rozpoczęciem badań
5. Autorka wykazała się dużą erudycją i doskonałą umiejętnością przedyskutowania uzyskanych wyników na tle zebranego piśmiennictwa.

Warszawa, 28 sierpnia 2019 roku

*Ewa Skopińska-Różewska*

Prof. dr hab. Ewa Skopińska-Różewska  
immunolog  
02-777 Warszawa, ul. Rejzla 61/B m.12  
nr um. NFZ: 980765131  
nr wyk. zaw. 1744301