



UNIwersyTET  
WARszawSKI

Wydział Biologii  
Zakład Immunologii  
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 10.09.2019r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Alicji Krejner-Bienias,  
zatytułowanej:**

**Wpływ kondensatów wydychanego powietrza na wybrane typy komórek hodowane *in vitro***

Praca doktorska Pani Alicji Krejner-Bienias została wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest dr hab. n. med. Tomasz Grzela.

Tematyka ocenianej pracy dotyczy kondensatów wydychanego powietrza, pobranych od dzieci chorych na astmę i dzieci zdrowych. Od czasu opisanie techniki zbierania kondensatu powietrza wydychanego podejmowane są próby analizy składu i roli kondensatów w diagnostyce schorzeń układu oddechowego, w tym astmy. Jest to szczególnie istotne w przypadku dzieci, gdzie wywiad jak również pozyskiwanie materiału do badań laboratoryjnych są wyjątkowo trudne. Tak więc, ocena kondensatów pobranych od dzieci, metoda bezpieczna i nieinwazyjna, może być potencjalnie ważną metodą diagnostyczną pozwalającą na wykrywanie obecności nietlonych związków w drogach oddechowych i w monitorowaniu przewlekłych stanów zapalnych. Na skład kondensatu mają wpływ różne procesy zapalne zachodzące w układzie oddechowym, m.in. astma atopowa. Prowadzone od lat badania pozwoliły na poszerzenie wiedzy w tym zakresie, ale nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi, w tym dotyczących działania kondensatów wydychanego powietrza na funkcję komórek, również komórek układu odpornościowego.

W ten nurt poszukiwań wpisują się badania prowadzone przez lekarz Alicję Krejner-Bienias. Podjęcie się zbadania oddziaływania kondensatów na podstawowe funkcje komórki należy uznać za ważne poznawczo zadanie naukowe z potencjałem aplikacyjnym.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to opracowanie naukowe, przedstawiające cykl prac eksperymentalnych lekarz Alicji Krejner-Bienias. Zgodnie z ustawą rozprawa doktorska może mieć formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopiśmie naukowych. Rozprawa doktorska lekarz Alicji Krejner-Bienias spełnia ten warunek. Monografia zawiera streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wstęp i krótkie omówienie tematyki badań zawartych w trzech załączonych publikacjach oraz podsumowanie wyników i bibliografię.

Załączone publikacje stanowią spójny tematycznie zbiór. Prowadzone badania Doktorantka podzieliła na trzy etapy. Pierwszy z nich oparła na wcześniejszych obserwacjach zespołu, dowodzących że kondensaty dzieci chorych na astmę, w przeciwieństwie do dzieci zdrowych, zawierały liczne czynniki regulujące proces angiogenezy, a jak wiadomo nadmierny rozrost naczyń jest wiązany z rozwojem astmy. W tej części pracy Doktorantka uzyskała ciekawe, choć dość zaskakujące wyniki, a mianowicie kondensaty pozyskane od dzieci zdrowych wykazywały działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek śródbłonna obserwowane w teście MTT, jak również wzrost odsetka komórek w stanie apoptozy, zmiany w morfologii czy aktywności metabolicznej badanych komórek. Doktorantka wykazała, że efekt był gatunkowo nieswoisty. Zmian tych nie obserwowano w obecności kondensatów pobranych od dzieci z astmą. Półilościowa analiza obecności wybranych cytokin przy użyciu mikromacierzy białkowych nie dała jednoznacznej odpowiedzi. Należy tu nadmienić, że badaniami objęto dużą grupę 105 cytokin prozapalnych i immunoregulacyjnych. Wyniki badań zostały opublikowane w pierwszej z załączonych publikacji. Obserwacja jest ciekawa i sugeruje pytanie, które kieruję do Doktorantki, czy ma własne przemyślenia co do znaczenie działania cytotoksycznego kondensatów pozyskanych od dzieci zdrowych?

W drugim etapie badań Doktorantka postanowiła sprawdzić czy obserwowany efekt jest tkankowo specyficzny, oceniając wpływ kondensatów wydychanego powietrza od pacjentów z astmą i dzieci zdrowych na ludzkie fibroblasty izolowane z tkanki płucnej oraz komórki ludzkiej linii keratynocytarnej. I tutaj również kondensaty wydychanego powietrza od dzieci zdrowych wykazywały działanie cytotoksyczne w stosunku do badanych komórek. Co ciekawe, zmiany morfologii komórek pojawiały się szybko, w ciągu pierwszych godzin inkubacji. Efekt był niezależny od typu badanych komórek, ale wpływ miało rozcieńczenie kondensatu. Stosując metodę spektrometrii masowej Doktorantka postanowiła podjąć próbę identyfikacji czynników odpowiedzialnych za obserwowane zmiany, a znajdujących się w badanych kondensatach. Jednakże, analiza porównawcza nie pozwoliła na wskazanie konkretnego czynnika odpowiedzialnego za działanie cytotoksyczne wybranych

kondensatów, chociaż zidentyfikowano 201 różnych peptydów i białek. Do ciekawych wyników rozprawy doktorskiej należy zaliczyć wytypowanie jednak dwóch białek które mogą być odpowiedzialne za ten efekt, hornerynę i BPIFA1. Stężenie obu białek było wyższe w kondensatach pozyskanych od dzieci zdrowych. Obserwacja ta może być podstawą prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Tutaj również przedstawiono publikację zawierającą uzyskane w eksperymentach wyniki.

W trzecim etapie badań, zakończonych załączoną publikacją, Doktorantka postanowiła scharakteryzować białka regulujące apoptozę indukowaną przez kondensaty od dzieci zdrowych. Przeprowadziła analizę próbek przy użyciu mikromacierzy białkowych. Dokładna analiza klasycznych dróg programowanej śmierci komórki pozwoliła Doktorantce sformułować hipotezę zakładającą, że aktywacja pod wpływem kondensatów wydychanego powietrza wykorzystuje prawdopodobnie inne, alternatywne szlaki indukcji apoptozy. Czy Doktorantka mogłaby zasugerować kierunek dalszych badań w tym zakresie?

Biorąc pod uwagę wszystkie rezultaty opisane w publikacjach składających się na rozprawę doktorską stwierdzam, że uzyskane wyniki należy uznać za ważne dla rozwoju badań w tym zakresie. Doktorantka zrealizowała postawione cele i opanowała szeroki wachlarz nowoczesnych metod badawczych. Uzyskane wyniki są omówione na tle dostępnej wiedzy a wnioski wyważone.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską lekarz Alicji Krejner-Bienias pozytywnie. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie prowadzonych badań. Wykazała się również umiejętnością samodzielnego wykonywania pracy naukowej. Rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Tym samym, przedstawiam Wysokiej Radzie Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wnioski o dopuszczenie lekarz Alicji Krejner-Bienias do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką jakość uzyskanych wyników i ich znaczenie poznawcze, a także na profesjonalny sposób ich opisu na tle aktualnego stanu wiedzy stawiam także wnioski o wyróżnienie niniejszej rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, znajomością i opanowaniem

nowoczesnych technik laboratoryjnych, jak również umiejętnością publikowania uzyskanych rezultatów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.



prof. Grażyna Korczak-Kowalska