

lek. Alicja Krejner-Bienias

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

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz Grzela

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Streszczenie pracy

Wstęp

Kondensat wydychanego powietrza (exhaled breath condensate, EBC) to roztwór skroplonej pary wodnej, zawierający mieszaninę nielotnych związków obecnych w drogach oddechowych. Jego skład odzwierciedla różne zjawiska zachodzące w układzie oddechowym, w tym obecność procesu zapalnego. Z tego powodu badanie EBC może być przydatne w diagnostyce i monitorowaniu przewlekłych chorób układu oddechowego, w tym m.in. astmy atopowej.

Wcześniejsze prace prowadzone przez nasz zespół wykazały, że kondensaty pochodzące od dzieci chorych na astmę zawierały liczne czynniki regulujące proces angiogenezy. Zwiększona zawartość tych czynników korelowała ze stopniem ciężkości astmy. W kondensatach od dzieci zdrowych wykrywano jedynie obecność trombospondyny-1.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu kondensatów wydychanego powietrza, pozyskanych od dzieci chorych na astmę i od zdrowych, na różne typy komórek hodowanych *in vitro*. Badane kondensaty poddano również analizie biochemicznej pod kątem zawartości wybranych czynników, mogących wpływać na ich właściwości biologiczne.

Materiały i metody

Do badań użyto próbek kondensatów pozyskanych od dzieci z łagodną astmą i od dzieci zdrowych. W testach *in vitro* wykorzystano:

- komórki mysiej linii śródbłonkowej (C166),
- ludzkie komórki śródbłonka izolowane z mikrokrążenia płucnego (Human Lung Microvascular Endothelial Cells, HLMVEC),
- ludzkie fibroblasty izolowane z tkanki płucnej (Human Lung Fibroblasts, HLF),
- komórki ludzkiej linii keratynocytarnej (HaCaT).

Wpływ kondensatów na żywotność i aktywność metaboliczną komórek w hodowlach *in vitro* oceniano za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej (MTT). Dodatkowo oceniano

morfologię komórek w hodowlach przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego oraz przeprowadzono test wiązania aneksyny V znakowanej fluoresceiną (FITC).

Analizę obecności potencjalnych czynników, odpowiedzialnych za aktywność biologiczną badanych kondensatów, przeprowadzono z wykorzystaniem mikromacierzy białkowych Proteome Profiler. Ponadto wybrane losowo próbki kondensatów poddano analizie metodą spektrometrii masowej.

Wyniki

Stwierdzono, że kondensaty pochodzące od dzieci z łagodną astmą wywierały niewielki wpływ na aktywność metaboliczną i żywotność komórek w testowanych hodowlach. Komórki hodowane w obecności kondensatów pozyskanych od dzieci zdrowych wykazywały wyraźne cechy uszkodzenia, typowe dla zjawiska apoptozy.

Analiza profilu cytokinowego nie wykazała istotnych różnic między próbkami kondensatów od dzieci chorych na astmę i od zdrowych. Podobnie badanie metodą spektrometrii masowej nie pozwoliło na jednoznaczną identyfikację czynnika odpowiedzialnego za obserwowany biologiczny efekt działania kondensatów.

Wyniki badań wybranych białek regulujących apoptozę indukowaną przez kondensaty pochodzące od dzieci zdrowych sugerują, że zjawisko to może być efektem aktywacji szlaków alternatywnych.

Wnioski

Kondensaty od dzieci zdrowych zawierają czynnik lub czynniki, wykazujące silną aktywność cytotoksyczną wobec wybranych komórek hodowanych *in vitro*. Biologiczne znaczenie tej substancji mogłoby polegać na hamowaniu nadmiernej proliferacji komórek prawidłowej błony śluzowej dróg oddechowych. Identyfikacja czynnika odpowiedzialnego za obserwowany efekt może mieć potencjalne zastosowanie praktyczne w profilaktyce i leczeniu chorób układu oddechowego, dlatego niezbędne są dalsze badania nad tym zagadnieniem.

Alicja Krejner-Bienias

LEKARZ
3585217

Alicja Krejner-Bienias

dr hab. n. med. Tomasz Orzeł
Specjalista chirurgii
990017