



Warszawa, 1 listopada 2024

Dr hab. n. med. i n. o zdr. Anna Różańska-Walędziak, prof. uczelni

Wydział Medyczny. Collegium Medicum

Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

Ul. Wóycickiego 1/3

01-938 Warszawa

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANNY MICHALAK-WIKALIŃSKIEJ

Rozprawa doktorska zatytułowana: „Ocena apoptozy limfocytów krwi obwodowej w odniesieniu do wybranych markerów odpowiedzi nieswoistej” to wnikliwa i głęboka analiza problemu reakcji wybranych komórek układu odpornościowego na kontakt z czynnikami infekcyjnymi obecnymi w bioaerozolach powietrza wewnętrznego.

Wybór tematyki badawczej w kontekście tak istotnego problemu, jakim jest wzrastające nasilenie zanieczyszczenia powietrza wewnętrznego bioaerozolami, które stanowią nowe zagrożenie dla zdrowia człowieka, stanowi dużą wartość zarówno naukową, jak i potencjalnie kliniczną pracy. Długotrwałe narażenie na toksyny bakteryjne czy wirusy może wpływać na funkcjonowanie układu odpornościowego, a w szczególności limfocytów biorących udział w zapoczątkowaniu reakcji immunologicznej. Limfocyty regulują odpowiedź immunologiczną na wnikające do organizmu patogeny, ich metabolity oraz ksenobiotyki. Po wypełnieniu swojej roli, podejmują proces apoptozy, który nie tylko przeciwdziała nadmiernej stymulacji układu odpornościowego przez obce antygeny, ale także indukuje stan tolerancji immunologicznej na własne białka. Zachwianie tego procesu może prowadzić do dysfunkcji ze względu na wydłużoną aktywację limfocytów T, a w dalszej konsekwencji doprowadzać do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych lub immunosupresji.

Promotorem pracy jest prof. dr hab. n. med. Janina Łucja Grzegorzczuk. Rozprawa doktorska powstała w Zakładzie Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Katedry Biologii i



Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca była finansowana ze środków przyznanych na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetyki nr RNN/165/13/KB.

Zanieczyszczenie środowiska, zmiany klimatyczne, nieprawidłowy styl życia, codzienna dieta bogata w konserwanty i sztuczne dodatki, a także ksenobiotyki, mogą negatywnie wpływać na sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego. Bioaerozole, ze względu na swój skład, mogą zakłócać działanie układu immunologicznego i zaburzać jego poszczególne mechanizmy obronne. W konsekwencji może być przyczyną reakcji alergicznych, kataru siennego, astmy, zapalenia oskrzeli, przewlekłej niewydolności płuc, nowotworów płuc, chorób układu sercowo-naczyniowego, przewodu pokarmowego, zapalenia zatok czy infekcji wirusowych. Mediatory uwalniane z dróg oddechowych po zadziałaniu antygenów i substancji znajdujących się w powietrzu wdychanym, dostają się do krążenia i mogą in vivo aktywować komórki układu immunologicznego. Aerozole biologiczne pochodzenia zewnętrznego powstają z drobnoustrojów oraz elementów pochodzenia organicznego znajdujących się między innymi w wodzie i glebie.

Wzrost stężenia bioaerozoli w środowisku wewnętrznym może być spowodowany m.in. nadmierną izolacją cieplną budynków, ich złym utrzymaniem, stosowaniem systemów klimatyzacyjnych, względnie wysoką wilgotnością panującą w pomieszczeniach, a także złą wentylacją i brakiem świeżego powietrza. Spośród cząstek bioaerozoli, największe zagrożenie dla zdrowia człowieka niosą małe komórki drobnoustrojów, które są zatrzymywane wewnątrz płuc i usunięcie ich stanowi dla organizmu duży problem. Bioaerozole mogą być przyczyną rozwoju chorób alergicznych oraz nowotworowych, a układ oddechowy człowieka jest układem szczególnie narażonym na kontakt z drobnoustrojami, w tym także bakteriami Gram-ujemnymi.

Proces apoptozy jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu, a jej rola niezwykle istotna w przebiegu infekcji wirusowych i bakteryjnych. Wirusy i bakterie kodują inhibitory apoptozy, które są niezbędne do wywołania reakcji zapalnej. W celu przedłużenia życia zainfekowanej komórki. Zaburzenia spowalniające przebieg procesu apoptozy mogą doprowadzać do rozwoju schorzeń nowotworowych, autoimmunologicznych oraz przewlekłych infekcji, a z kolei nadmierna apoptoza może doprowadzać do powstawania chorób neurodegeneracyjnych, a także



nasilać powikłania procesów niedokrwienia. Mutacje genów uczestniczących w procesach apoptozy i proliferacji komórek oraz genów naprawy DNA zidentyfikowano jako czynniki przyczynowe chorób nowotworowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 214 stron z zamieszczonymi w tekście: spisem treści, wykazem skrótów, wstępem, założeniami i celem pracy, materiałem i metodami, wynikami, dyskusją, wnioskami, streszczeniami w języku polskim i angielskim, spisem rycin, spisem tabel oraz bibliografią.

Układ tekstu pracy jest typowy i zgodny dla tego rodzaju opracowań naukowych ze stosownym podziałem na rozdziały odpowiednio tematycznie związane z treścią. We wstępie doktorantka przedstawiła w interesujący sposób zagadnienie znaczenia bioaerozoli dla zdrowia człowieka, wskazała na potencjalne zagrożenia związane z ich obecnością w środowisku, a także w dokładny sposób opisała mechanizmy ludzkiej odpowiedzi immunologicznej w związku z kontaktem z wybranymi czynnikami infekcyjnymi. Uzupełnienie wstępu o przejrzyste ryciny i schematy pozwala na dokładniejsze zrozumienie szlaków reakcji immunologicznych organizmu. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa światowego, co dało niezbędne uzasadnienie teoretycznych i praktycznych podstaw jej opracowania, a także wyboru metod badawczych.

Założenia oraz cel pracy doktorskiej przedstawiono jasno i przejrzysto, z wyraźnym wskazaniem przesłanek naukowych do podjęcia badań. Materiał do badań uzyskany został od 30 zdrowych osób, honorowych dawców krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi, a analizy zostały przeprowadzone w Zakładzie Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Katedry Biologii i Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu technologii ImageStream w celu analizy apoptozy uprzednio wyizolowanych limfocytów. Doktorantka dokonała również analizy rozpuszczalnych markerów apoptozy: ICE-CASPASA-1, FAS/CD95, TNF- α oraz biomarkerów odpowiedzi nieswoistej: defensyny, katelicydyna LL-37, Granzym B, IL-10, IL-17A, IL-22. Badania mają wysoką wartość naukową oraz potencjalną przydatność kliniczną, a zostały przeprowadzone na bardzo wysokim poziomie.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 13.1, do sprawdzenia normalności rozkładu prób badanych został wykorzystany test Kołmogorowa-



Smirnowa z poprawką Lillieforsa oraz test W Shapiro-Wilka. Do badania zależności parametrów, które nie wykazywały rozkładu normalnego, zastosowany został test nieparametryczny - test kolejności par Wilcoxon. W celu oceny zależności pomiędzy parametrami wykazującymi rozkład normalny zastosowano test parametryczny t - studenta. Za poziom ufności przyjęto $p < 0,05$.

Po 48 godzinach hodowli komórek z próby spontanicznej zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą apoptozę limfocytów CD4+, CD8+, CD56+ w porównaniu do odsetka tych komórek w czasie T0. Średnia wartość odsetka subpopulacji limfocytów CD4+, CD8+, CD56+ we wczesnej i całkowitej apoptozie pod wpływem PHA w próbie po 48 godzinach hodowli była wyższa w porównaniu do komórek próby spontanicznej ($p < 0,05$). Odsetek limfocytów CD4+, CD8+, CD56+ na poszczególnych etapach apoptozy po 48 godzinach hodowli pod wpływem lipopolisacharydu (LPS), enterotoksyny gronkowcowej A (SEA) oraz ludzkiego wirusa paragrypy typu 3 (HPIV-3) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do próby spontanicznej ($p < 0,05$).

Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie wzrost wydzielania stężenia: ICE caspazy-1, Fas/CD95/APO1, TNF- α , katelicydyny LL-37, IL-10, IL 17A, IL-22 w hodowli limfocytów pod wpływem PHA, LPS, SEA, HPIV3 w porównaniu do próby spontanicznej oraz pomiędzy próbami stymulowanymi PHA vs HPIV3, PHA vs LPS, PHA vs SEA, PHA vs HPIV3, SEA vs HPIV3. Widoczny jest również istotny statystycznie wzrost stężenia wydzielania Granzymu B w obecności PHA, LPS i SEA oraz niższe stężenie wydzielania tego markera w obecności HPIV-3 w odniesieniu do próby spontanicznej.

Doktorantka wskazuje również na istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji mRNA genu TLR1 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h w próbach stymulowanych LPS, SEA, HPIV3, a także wzrost poziomu ekspresji mRNA genu TLR3 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h dla prób stymulowanych HPIV3, jak również wzrost poziomu ekspresji mRNA genu TLR4 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h w próbach stymulowanych LPS oraz HPIV3.

Wyniki są przedstawione w bardzo dokładny i poprawny naukowo sposób, a ich interpretację ułatwia przejrzysty podział na podrodział, a także ryciny oraz wykresy.

W dyskusji autorka podejmuje dojrzałą analizę porównawczą wyników uzyskanych w swoim badaniu z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Zaznacza duże znaczenie obecności bioaerozoli w



powietrzu wewnętrznym dla zagrożenia zdrowia człowieka, co jest udokumentowane licznymi odniesieniami do piśmiennictwa międzynarodowego. Doktorantka dokonuje również omówienia porównawczego znaczenia poszczególnych składników infekcyjnych wchodzących w skład bioaerozoli, a także wpływu ich obecności na funkcjonowanie poszczególnych składowych układu immunologicznych, uwzględniając zarówno czynniki wirusowe, jak i bakteryjne. Wskazuje też na duże znaczenie oznaczania stężenia rozpuszczalnych markerów apoptozy. Dyskusja jest prawidłowo zorganizowana i przeprowadzona, w przejrzysty sposób przedstawia wyniki uzyskane w badaniu na tle piśmiennictwa światowego. Umiejętność porównania uzyskanych wyników z badaniami innych autorów wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki.

We wnioskach doktorantka dokonała zwięzłego i spójnego podsumowania wyników przeprowadzonych badań. Autorka podkreśla, że zastosowane w badaniach czynniki infekcyjne LPS, SEA HPIV-3, które są obecne w bioaerozolach powietrza wewnętrznego w istotny sposób nasilają proces apoptozy limfocytów krwi obwodowej osób zdrowych, który może być modulowany przez generowanie poszczególnych markerów odpowiedzi nieswoistej. Doktorantka stwierdza, że ekspresja mRNA genu dla poszczególnych receptorów TLR wykazuje zróżnicowany poziom w zależności od czasu hodowli limfocytów jak również od rodzaju i wpływu czynnika biologicznego. Przedstawione w rozprawie doktorskiej obserwacje potwierdzają, że czynniki infekcyjne obecne w bioaerozolach mogą mieć znaczący wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego człowieka i mogą być przyczyną osłabienia komórek immunologicznie kompetentnych, co może zwiększać zapadalność na choroby układu oddechowego.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam moje uwagi wobec rozprawy doktorskiej:

- Obecność drobnych błędów stylistycznych i edytorskich
- Brak wyjaśnienia wybranych skrótów użytych w tekście rozprawy
- Brak aktualności niektórych pozycji piśmiennictwa

Wyżej wymienione błędy nie umniejszają wartości pracy.

PODSUMOWANIE



Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Anny Michalak-Wikalińskiej „Ocena apoptozy limfocytów krwi obwodowej w odniesieniu do wybranych markerów odpowiedzi nieswoistej” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia kryteria rozprawy doktorskiej zgodnie z wymogami art. 190 ust. 2 i 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Zakres opracowanych zagadnień mieści się w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Wnioskuję zatem o dopuszczenie mgr Anny Michalak-Wikalińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na unikatowość naukową, przydatność kliniczną i wybitne opracowanie podjętego problemu badawczego wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

dr hab. n. med. i n. o zdr. Anna Różańska-Walędziak,
prof. uczelni

Prodziekan ds. Przedklinicznych
Wydział Medyczny. Collegium Medicum
Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego
w Warszawie

UKSW