



Warszawa, dnia 30.03.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień pt. „Wpływ pyłu zawieszonego w powietrzu na nabłonek oddechowy w interakcjach pomiędzy nabłonkiem, komórkami dendrytycznymi i makrofagami w obturacyjnych chorobach płuc”

przygotowanej w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

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

Podstawą formalną wykonania recenzji był dokument z dn. 30.01.2023 o numerze RDNM/D/80/2023 podpisany w Warszawie przez wiceprzewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Martę Strugę, zgodnie z którym zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień.

Wzrastające zanieczyszczenie środowiska jest jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego. W szczególności zanieczyszczenia powietrza, w tym pyłami zawieszonymi pochodzenia antropogenicznego, stanowi problem dotyczący coraz większej populacji, a ekspozycja na tego typu zanieczyszczenie jest trudna do uniknięcia. Pyły zawieszone mogą negatywnie oddziaływać na komórki dróg oddechowych osób zdrowych, a zarówno badania epidemiologiczne jak i translacyjne wykazały ich niepodważalny negatywny wpływ na przebieg chorób obturacyjnych i występowanie ich zaostrzeń. Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) i astma są głównymi jednostkami powodującymi choroby układu oddechowego. Zachorowalność na POChP wzrasta do tego stopnia, że aktualnie choroba ta jest jedną z czołowych przyczyn zgonów na świecie.

Chociaż wpływ pyłów zawieszonych na odpowiedź komórek nabłonka dróg oddechowych jest dobrze opisany, zdecydowanie mniej wiadomo o oddziaływaniu pyłów zawieszonych na skomplikowane interakcje pomiędzy komórkami



strukturalnymi oraz komórkami układu odpornościowego dróg oddechowych. W świetle tych faktów, uważam, że temat rozprawy złożonej przez Panią mgr inż. Paulinę Misiukiewicz-Stępień doskonale wpisuje się w kierunek istotnych badań.

Przedstawiona do mojej recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech publikacji naukowych, które ukazały się w latach 2021-2022. Wszystkie trzy prace zostały opublikowane w języku angielskim, w czasopismach znajdujących się w wykazie czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki oraz uwzględnionych w indeksie *Journal Citation Reports*, gdzie charakteryzują się wysokimi wartościami *Impact Factor*, tj. *Clinical Immunology*: IF=10,19; MEiN=100pkt.; *Scientific Reports*: IF=4,996; MEiN=140pkt.; *International Journal of Molecular Sciences*: IF=6,208; MEiN=140pkt. Łączna suma punktów MEiN publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 380pkt, a łączny IF wynosi 21,393. We wszystkich przedłożonych artykułach Pani mgr inż. Paulina Misiukiewicz-Stępień jest pierwszą autorką, a oświadczenia doktorantki oraz współautorów wskazują jednoznacznie na wiodącą rolę doktorantki w uszczegółowieniu koncepcji badań, przeprowadzeniu doświadczeń oraz pisaniu manuskryptów. Na podstawie powyższych stwierdzeń wysoko oceniam specjalistyczną wiedzę oraz umiejętności doktorantki w zakresie tematyki rozprawy.

Dysertacja została poprawnie skonstruowana i ma charakter typowy. Rozprawa doktorska obejmuje 127 stron standardowego maszynopisu, zawiera wykaz słów kluczowych, wykaz publikacji będących podstawą rozprawy, spis treści, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, kopie opublikowanych artykułów, podsumowanie, wnioski oraz stosowną opinię Komisji Bioetycznej i wykaz piśmiennictwa. Ponieważ podstawą rozprawy są opublikowane artykuły naukowe, doktorantka zamieściła również oświadczenia współautorów określające udział w tworzeniu publikacji. Układ rozprawy jest przejrzysty, przygotowany z należytą starannością. Należy zwrócić uwagę na klarowne ryciny, które pomagają czytelnikowi prześledzić układ doświadczalny, a także podsumowują najważniejsze wyniki. W rozdziale „Podsumowanie”



obejmującym 5 stron maszynopisu, doktorantka przeprowadziła analizę krytyczną otrzymanych wyników. Przeprowadzona dyskusja w świetle wcześniej opublikowanych prac świadczy o dużej znajomości literatury tematu przez doktorantkę, a także zdolności do poprawnej i krytycznej interpretacji wyników własnej pracy. W jednostronicowym rozdziale „Wnioski”, doktorantka dokonała zwięzłego podsumowania najważniejszych i prawidłowo sformułowanych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Wobec tak wysokiej jakości przygotowania rozprawy, nie mam uwag do jej poprawności redakcyjnej.

Ponieważ artykuły będące podstawą rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, były one już poddane należytej recenzji merytorycznej przez ekspertów. W związku z tym ograniczę się w swojej recenzji do krótkiego podsumowania tych prac.

Pierwszy z artykułów: *'Biological effect of PM10 on airway epithelium-focus on obstructive lung diseases.'*, jest artykułem przeglądowym, w którym doktorantka wspólnie z pozostałymi autorami dokonała bardzo obszernej analizy problemu wpływu pyłów zawieszonych na komórki nabłonka oddechowego w chorobach płuc. Opisane zostały różne aspekty pochodzenia pyłów, ich składu, efektów na komórki nabłonka oddechowego oraz układ odpornościowy dróg oddechowych i wpływu na przebieg chorób obturacyjnych. Warto podkreślić olbrzymi wysiłek wykonany przez autorki, o którym świadczy nie tylko doskonały tekst, ale również 191 cytowanych piśmienniczych. Niewątpliwie przygotowanie tego artykułu świadczy o posiadanej wiedzy eksperckiej przez doktorantkę.

Drugi z przedstawionych artykułów: *„Interactions of nasal epithelium with macrophages and dendritic cells variously alter urban PM-induced inflammation in healthy, asthma and COPD.”* przedstawia oryginalne badania, w których stosując zaawansowany model ko-hodowli pierwotnych komórek nabłonka z błony śluzowej nosa z monocytami oraz komórkami dendrytycznymi różnicowanymi z monocytów pochodzących od osób zdrowych, chorych z astmą i POChP, zbadano wpływ pyłu zawieszonego na odpowiedź komórek nabłonkowych.



Doktorantka wraz z pozostałymi autorami wykazała kluczowy wpływ interakcji komórek dendrytycznych na odpowiedź komórek nabłonka oddechowego na pyły zawieszone. Ponadto dowiedli różnicowej odpowiedzi zapalnej ko-hodowli od osób zdrowych, chorych na astmę oraz POChP na pyły zawieszone, co pogłębia wiedzę na temat patogenezы chorób obturacyjnych płuc i dostarcza nowych informacji na o wpływie pyłów na ich przebieg. Wykazany został także istotnie większy wpływ pyłów na rozszczelnienie połączeń międzykomórkowych w hodowlach wyprowadzonych od pacjentów z chorobami obturacyjnymi w porównaniu do komórek pobranych od osób zdrowych.

Trzeci artykuł: *'RNA-Seq Analysis of UPM-Exposed Epithelium Co-Cultivated with Macrophages and Dendritic Cells in Obstructive Lung Diseases'* opisuje analizę transkryptomu komórek nabłonka w opisanym wcześniej modelu ko-hodowli po stymulacji pyłami zawieszonymi. Doktorantka wraz z pozostałymi autorami wykazała znaczące różnice w ekspresji genów, w tym w oparciu o analizy wzbogacenia KEGG i GO, wskazujących na odrębną regulację szlaków wewnątrzkomórkowych w komórkach nabłonka oddechowego od osób zdrowych, chorych na astmę oraz POChP. Dzięki metodom analizy nienadzorowanej zidentyfikowano, a następnie zwalidowano za pomocą techniki qPCR wzrost ekspresji genów takich jak ENPEP, BPIFA2 w komórkach nabłonkowych pochodzących od pacjentów z chorobami obturacyjnymi stymulowanych pyłami zawieszonymi, w porównaniu do komórek pochodzących od zdrowych dawców. Są to nowatorskie odkrycia o potencjale do wykorzystania w badaniach translacyjnych nad biomarkerami i celami terapeutycznymi w chorobach obturacyjnych płuc.

Przedłożoną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym. Doktorantka zwięźle i dokładnie wprowadziła czytelnika w obszar badawczy w rozdziale „Wstęp”. Współautorstwo w obszernej publikacji przeglądowej świadczy o dużej wiedzy teoretycznej doktorantki na temat przedmiotu rozprawy. W pozostałych dwóch artykułach Kandydatka wykorzystwała i opisała dokładnie nowoczesne techniki badawcze, takie jak metody



immunoenzymatyczne, cytometryczne, qPCR. Należy podkreślić unikatowość zastosowanego modelu ko-hodowli komórek nabłonka oddechowego z komórkami dendrytycznymi i makrofagami. Jest to cenny i trudny model badawczy, który jednak pozwala na modelowanie skomplikowanych interakcji międzykomórkowych w układzie oddechowym. Doktorantka wykorzystała także umiejętnie metody wielkoskalowe sekwencjonowania nowej generacji RNA i zaawansowanych analiz bioinformatycznych. Poprawność wyciągania wniosków i dyskusji uzyskanych wyników została już oceniona przez recenzentów artykułów oryginalnych. Pragnę jednak podkreślić, że na podstawie przedłożonej dysertacji nie mam wątpliwości co do umiejętności Doktorantki: krytycznej analizy, interpretacji własnych wyników i przeprowadzenia dyskusji z istniejącą literaturą tematu.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień, stanowi istotny wkład do istniejącej wiedzy na temat oddziaływania pyłów zawieszonych na odpowiedź komórek nabłonka oddechowego zarówno osób zdrowych jak i w chorobach obturacyjnych. Nie mam istotnych zastrzeżeń merytorycznych do przedłożonej rozprawy, niemniej z obowiązku recenzenta pozwolę sobie przedstawić poniższe uwagi i pytania:

- Chociaż Doktorantka jasno sprecyzowała cele pracy, nie przedstawiła jednak hipotezy badawczej, która mogłaby stanowić podstawę przeprowadzenia badań.
- W artykule '*Interactions of nasal epithelium with macrophages and dendritic cells variously alter urban PM-induced inflammation in healthy, asthma and COPD*' opisano spadek ekspresji powierzchniowej cząsteczek EGFR oraz ST2 na komórkach nabłonka rzęskowego hodowanych od zdrowych ochotników po stymulacji pyłami. Doktorantka spekuluje, że może być to związane z zablokowaniem miejsca wiązania przeciwciał na tych receptorach przez duże ilości ligandów. Zweryfikowanie tej interpretacji za pomocą innych metod oznaczania poziomu ekspresji białek receptorowych



stanowiłoby cenne uzupełnienie pracy.

- Ostatni wniosek dotyczący wyników analizy transkryptomicznej, w którym Doktorantka stwierdza, że stymulacja pyłem „pobudziła odpowiedź immunologiczną, w szczególności rekrutację leukocytów” jest nieprecyzyjne, ponieważ uzyskane wyniki dotyczą jedynie zmian ekspresji genów w komórkach nabłonka, które w analizach GO i KEGG zostały przypisane do ustalonych zbiorów o konkretnych nazwach. Wyniki te jedynie sugerują możliwe efekty funkcjonalne i muszą być interpretowane z ostrożnością i w kontekście danego typu komórki.
- Opisane przez Doktorantkę efekty działania pyłów zawieszonych wskazują na modulację odpowiedzi lokalnego układu odpornościowego dróg oddechowych. Mimo, że nie było to celem pracy doktorskiej, warto byłoby przedyskutować uzyskane wyniki w kontekście zwiększonej wrażliwości pacjentów z chorobami obturacyjnymi płuc na zakażenia układu oddechowego podczas ekspozycji na pyły.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. **Pauliny Misiukiewicz-Stępień** pt. „Wpływ pyłu zawieszonego w powietrzu na nabłonek oddechowy w interakcjach pomiędzy nabłonkiem, komórkami dendrytycznymi i makrofagami w obturacyjnych chorobach płuc”. **spełnia warunki** określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Misiukiewicz-Stępień i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę także o wyróżnienie rozprawy ze względu na wysoką wartość merytoryczną, zastosowanie unikalnego modelu badawczego i zaawansowanych technik analitycznych oraz uważną interpretację uzyskanych wyników. Wysoka jakość rozprawy potwierdzona jest także publikacjami w uznanych czasopismach naukowych.

dr hab. n. med. Tomasz Skirecki, prof. CMKP