



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
EU Centre of Excellence in Neurobiology, *BRAINS*

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 589 22 07; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.edu.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski,
Pracownia Biologii Mitochondriów i Metabolizmu
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 19 lutego 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Zuzanny Sas**

**p.t.: "Identyfikacja i zbadanie nowego mechanizmu
wychwytu wolnej hemoglobiny w wątrobie u myszy"**

Promotor: dr hab. Tomasz Rygiel

Celem pracy doktorskiej mgr Zuzanny Sas było zbadanie i scharakteryzowanie alternatywnego i niezależnego od haptoglobiny i receptora CD163 mechanizmu wychwytu wolnej hemoglobiny. Zagadnienie, nad którym pracowała doktorantka, uważam za niezwykle ważne, a wyniki przez nią przedstawione za istotne i prowadzące do poszerzenia naszej wiedzy na temat roli sinusoidalnych komórek śródbłonka wątroby w wychwycie wolnej hemoglobiny. Wyniki uzyskane przez doktorantkę przełamują, swojego rodzaju dogmat, o dominującej roli makrofagów w tym procesie. Jednocześnie jej badania ukazały potencjalne możliwości sinusoidalnych komórek śródbłonka wątroby w detoksykacji hemoglobiny w warunkach hemolizy oraz jakie mogą być konsekwencje wysokiego poziomu hemoglobiny w tych komórkach, w kontekście patologii śródbłonka w chorobach hemolitycznych.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca liczy 104 strony, zawiera 24 ryciny i 3 tabele. Układ recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Sas jest typowy. Rozprawa doktorska składa się z dwunastu rozdziałów: (I) Informacji wprowadzających zawierających informacje o finansowaniu badań, (II) Spisu rycin, (III) Spisu tabel, (IV) Wykazu

stosowanych skrótów, (V i VI) streszczeń w języku polskim i angielskim, (VII) Wstępu, (VIII) celu i założeń pracy, (IX) części opisujących materiały i metody wykorzystane w niniejszej pracy, (X) Wyników badań, (XI) Dyskusji, (XI) Wniosków oraz (XII) Spisu literatury. Do rozprawy doktorskiej załączono także zgody II Lokalnej Komisji Etycznej na wykonanie badań z wykorzystaniem zwierząt.

Zabrakło mi w rozprawie takich informacji jak np. podsumowanie dorobku naukowego doktorantki. Jedną z prac w których doktorantka jest współautorem, poniekąd dotyczy hemoglobiny, jednakże w kontekście wykorzystania jej jako „nośnika”- cargo dla substancji przeciwnowotworowych. Nie znalazłem także informacji o tym, czy doktorantka prezentowała uzyskane przez nią wyniki na konferencjach i zjazdach naukowych, lub też czy w okresie wykonywania rozprawy doktorskiej odbywała jakieś krajowe bądź zagraniczne staże badawcze. Dodatkowo, lektura rozprawy doktorskiej pozwoliła mi na spostrzeżenie, że niektóre z badań, bądź procedur wykonano we współpracy z innymi jednostkami badawczymi, np.

- Barwienie erytrocytów z wykorzystaniem zestawu PKH67 *Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit* wykonano we współpracy z mgr. Patrykiem Ślusarczykiem z Laboratorium Homeostazy Żelaza w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.
- Pobieranie hemoglobiny w hodowli pierwotnych komórek wątroby wykonano we współpracy z dr. Kamilem Jastrzębskim z Laboratorium Biologii Komórki w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
- Preparaty z wątroby i obrazowanie zostały wykonane we współpracy z dr. Anetą Jończy z Laboratorium Homeostazy Żelaza w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.
- Obrazowanie makropinosomów wykonano we współpracy z mgr. Martą Chwałek z Laboratorium Biologii Komórki w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę finansowane były z Grantu TEAM TECH finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, nr. TEAMTECH/2016-1/8, pt. „*Innovative cell-based, targeted drug delivery method to the tumour*”, którego kierownikiem był promotor pracy doktorskiej, dr hab. Tomasz Rygiel.

Ocena poszczególnych rozdziałów pracy

Wstęp zawarty w rozprawie doktorskiej został napisany rzeczowo, w bardzo interesujący i przemyślany sposób. Stanowi doskonałe źródło informacji dotyczących mikroskopowej budowy wątroby, wraz z opisem roli jaką pełnią sinusoidalne komórki śródbłonka wątroby i komórki Browicza-Kupffera. Doktorantka przedstawia podstawowe informacje dotyczące hemolizy erytrocytów i metabolizm hemoglobiny, jak również przybliży czytelnikowi zagadnienie makropinocytozy, oraz mechanizm jej inicjacji przez zależną od β -kateniny ścieżkę sygnałową Wnt. We wstępie Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów. Mimo iż w żaden sposób nie obniżają one waloru ocenianej pracy, czuję się w obowiązku je wymienić;

- 1) Na stronie 19. Doktorantka pisze: „W stanie fizjologicznym, komórki gwiaździste są uśpione, natomiast w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki, ulegają aktywacji i angażują się w proces włóknienia”. Mam pytanie co Doktorantka miała na myśli pisząc uszkodzenie tkanki. A co ze stanem zapalnym?
- 2) Na stronie 23 Doktorantka pisze: „Ze względu na ograniczoną ilość mitochondriów, komórki LSEC prowadzą metabolizm beztlenowy, a wytworzony mleczan może być wykorzystywany jako źródło energii dla hepatocytów.” Według mnie jest to trochę „niefortunne” sformułowanie. Czy to oznacza, że w sinusoidalnych komórki śródbłonka wątroby nie zachodzi oksydacyjna fosforylacja? A może - przeważa metabolizm beztlenowy?
- 3) Na stronie 29 Doktorantka pisze: „Podstawowym celem hemolizy pozanaczyniowej jest eliminacja krążących erytrocytów, które uległy procesowi starzenia.”. Chciałem zauważyć, że wszystkie erytrocyty stopniowo się starzeją. Lepiej było by użyć sformułowania "starzejących się" erytrocytów.
- 4) Na stronie 31 Doktorantka pisze: „W rezultacie, tempo uwalniania żelaza do krążenia może przewyższyć szybkość jego wychwytu przez transferynę, powodując krążenie żelaza niezwiązanego z transferyną (głównie Fe^{3+}), które jest wysoce toksyczne.” Co doktorantka ma na myśli pod pojęciem „toksyczne”?
- 5) Ta sama strona (31), Doktorantka pisze: „Zaobserwowano, że śledziona jest nasycona pozostałościami błon erytrocytów, które utraciły zawartość hemoglobiny i są wychwytywane... itd.” Chyba utraciły hemoglobinę, a nie jej zawartość.
- 6) Na stronie 33 Doktorantka pisze: „Stwierdzono, że w obecności Wnt, duże ilości pakietów zawierających białka i glikoproteiny, są kierowane do lizosomów poprzez fuzję z mniejszymi pęcherzykami zawierającymi...itd”. Bardzo bym prosił o sprecyzowanie

czy chodzi o samą obecność WNT, czy też liganda, bądź że Doktorantka miała na myśli aktywację ścieżki WNT.

Pomimo, że **Materiały i Metody** zostały opracowane przez Doktorantkę starannie, podczas lektury tej części pracy nasunęły mi się pewne uwagi i komentarze:

- 1) Na stronie 38, pkt. 3.5.1. Iniekcje dożylnie; Doktorantka pisze: „W celu farmakologicznej deplecji makrofagów myszom wstrzykiwano dożylnie liposomy zawierające kwas kłodronowy na 24 godziny... itd.”. Bardziej poprawne było by sformułowanie: „24 godziny przed doświadczeniem”.
- 2) Na stronie 38, pkt. 3.6.1. Izolacja komórek nieparenchymalnych i hepatocytów z wątroby; Doktorantka pisze: „W celu izolacji komórek nieparenchymalnych, płaty wątroby pobierano i perfundowano PBS za pomocą pompy perystaltycznej.” Mam pytanie o samą procedurę. Czy każdy płat wątroby z osobna perfundowano? Czy też perfundowano wątrobę? Tak jak opisano poniżej na stronie 39.
- 3) Na stronie 39, pkt. 3.6.2. Izolacja komórek śledziony; Doktorantka pisze: „Następnie kawałki narządu przepuszczano przez sitko do separacji komórek o średnicy porów 100 μm , wypłukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut).” Tutaj jak i w innych miejscach Doktorantka nie uniknęła żargonu laboratoryjnego. Bardziej poprawne było by napisanie, że zawieszano w PBS i wirowano. Ponadto w tej samej procedurze Doktorantka powinna podać w jakiej objętości buforu do lizy erytrocytów zawieszano osad komórek. Tutaj także stwierdzenie „po czym płukano PBS i wirowano” powinno być zastąpione „zawieszano w PBS i wirowano”.
- 4) Strona 39. pkt. 3.6.3. Izolacja komórek szpiku kostnego; brakuje mi objętości buforu do lizy erytrocytów dodanego do osadu komórek szpikowych.
- 5) Strona 40. pkt. 3.6.4. Izolacja komórek aorty; brakuje objętości mieszaniny w jakiej trawiono enzymatycznie aortę.
- 6) Strona 40. pkt. 3.7. Cytometria przepływowa; Szkoda, że Doktorantka nie podała liczby wysortowanych komórek i w jakiej objętości je zawieszono w roztworze barwnika do oceny żywotności. Dodatkowo, zabrakło miana przeciwciał znakowanych fluorochromami.
- 7) Strona 46. pkt. 3.10.2. Zbadanie pobierania Hb przez komórki LSEC i KC za pomocą barwienia immunohistochemicznego; Czy wykorzystana procedura nie wymaga użycia buforowanego paraformaldehydu? Czy użyte przeciwciała anti-CD146 i anti-F4/80 nie wymagały wykorzystania przeciwciał II rzędowych? Jeśli nie, to powinno

być podkreślone, i np. dla przeciwciał anti-F4/80 informacje takie jak wzbudzenie (488 nm) i emisja (561 nm) powinny być podane. Jakie przeciwciało do detekcji komórek LSEC anti-CD146 (z Biolegend) wykorzystano? wymagające przeciwciała II rzędowego czy też FITC bądź Alexa Fluor. W tej części Doktorantka nie uniknęła błędów językowych takich jak „Po inkubacji przeciwciał tkanki przemywano...”.

- 8) Strona 46. pkt. 3.10.3. Obrazowanie makropinosomów za pomocą mikroskopu konfokalnego; Doktorantka pisze: „Następnie komórki permeabilizowano i blokowano...” Bardziej trafne było by sformułowanie „uprzepuszczalniano”.
- 9) Strona 49. pkt. 3.13.1. Przygotowanie ^{131}I -Hb; Doktorantka podaje, że na pewnym etapie „Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 122 minuty.” Czy czas 122 minuty (a nie 120) jest czymś podyktowany?
- 10) Strona 49. pkt. 3.13.2. Podanie i pomiar aktywności ^{131}I -Hb; W tej procedurze wykorzystano inny sposób uśmiercenia myszy. Czy było to czymś spowodowane?

W części **Wyniki** mgr Zuzanna Sas w sposób bardzo profesjonalny przedstawiła wyniki swoich badań, co wskazuje na jej dojrzałość naukową. Zastosowane podejście eksperymentalne zasługuje na wyróżnienie. Na podstawie tej części pracy nie mam wątpliwości, że cele pracy przedstawione przez Doktorantkę zostały w pełni osiągnięte.

Do tej części pracy mam następujące komentarze i pytania:

- 1) Strona 63. Rycina 13. Doktorantka pisze: „Z dwóch typów badanych komórek tylko KC wykazały ekspresję Cd163 (Ryc. 13) co sugeruje, że pobieranie Hb przez LSEC nie jest skorelowane z ekspresją receptora CD163.”. Mam do Doktorantki takie przewrotne pytanie. Czy na podstawie tej obserwacji i wyników przedstawionych na Rycinie 14 można wysnuć wniosek, że komórki pozbawione receptora CD163 pobierają wydajniej hemoglobinę i kompleks hemoglobiny i haptoglobiny? Chciałbym poznać opinie Doktorantki w tej kwestii.
- 2) Strona 64. Czy myszy wykorzystane do zbadania wpływu obecności Hp na pobieranie hemoglobiny przez komórki LSEC i KC miały tę samą wagę, rozmiar?
- 3) Rycina 14. Jak jest „n” dla panelu A i B?
- 4) Strona 66. 4.8. Zbadanie efektu wolnej hemoglobiny na homeostazę wątroby. Co doktorantka miała na myśli pisząc – homeostazę wątroby? Czy mogę prosić o uszczegółowienie i wyjaśnienie wyboru badania ekspresji genów *Hmox-1*?
- 5) Strona 67. Rycina 16. jaki może być mechanizm/przyczyna spadku ekspresji genu *Ccl2* i *Hmox-1* po pięciu godzinach po podaniu hemoglobiny?

Dyskusja napisana jest z dużą znajomością przedmiotu. Czytelnik zapoznaje się z przemyślaną analizą uzyskanych wyników i osiągnięć wynikających z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Dodatkowo, można powiedzieć, że Doktorantka wyręczyła recenzenta wymieniając najważniejsze osiągnięcia swojej pracy badawczej. Do tej części mam tylko jedno pytanie. Doktorantka pisze, że w kontekście chorób hemolitycznych, warto byłoby zbadać czy wysoki poziom wychwytu hemoglobiny w sinusoidalnych komórkach śródbłonna wątroby wywołuje w nich stres oksydacyjny. Czy doktorantka ma jakieś przypuszczenia, czy rzeczywiście tak może być? Czy są jakieś przesłanki, które mogą o tym świadczyć?

Po wnikliwym zapoznaniu się z zaprezentowanymi wynikami badań oraz dyskusją w pełni zgadzam się z wnioskami przedstawionymi przez Doktorantkę w podsumowaniu jej rozprawy doktorskiej.

Dodatkowo, czego nie mogę pominąć w swojej recenzji, (a co nie zostało w żaden sposób pokazane w przedstawionej mi do recenzji dokumentacji), jest fakt, że dorobek naukowy mgr Zuzanny Sas nie ogranicza się tylko do wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, ale składa się na niego także osiem innych, opublikowanych prac. Jednakże na podstawie tytułów oceniam, że są one związane z poboczną aktywnością naukową doktorantki, nie związaną z głównym nurtem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej. W jednej z nich (praca przeglądowa) doktorantka jest autorem wiodącym. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest współautorką prac w takich renomowanych czasopismach jak: „*Cancer immunology research*”, czy „*American Journal of Hematology*” (praca opublikowana w 2024 roku). Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor jej dorobku publikacyjnego wynosi 54,45, a jej prace były dotychczas zacytowane 353 razy.

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest napisana bardzo dobrze i przedstawia nowe odkrycia badawcze. Przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczące rozprawy mgr Zuzannę Sas w większości mają charakter drugorzędny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały przez Autorkę właściwie uzasadnione. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę nie zostały jeszcze opublikowane, jednakże jestem przekonany, iż będą one podstawą pracy w czasopiśmie naukowym o międzynarodowym zasięgu. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do

recenzji praca doktorska mgr Zuzanny Sas doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Zuzanny Sas do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę wartość naukową wyników, zwracam się wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Sas.



Mariusz R. Więckowski