

Kraków, 17.04.2024



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA

Pracy doktorskiej pani mgr Zuzanny Sas,
doktorantki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Tytuł pracy:

"Identyfikacja i zbadanie nowego mechanizmu
wychwytu wolnej hemoglobiny w wątrobie u myszy"

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

Mechanizmy usuwania starych erytrocytów i ich znaczenie w gospodarce żelazem są badane od lat, dzięki czemu zostały stosunkowo dobrze poznane. Wiadomo również, że część erytrocytów ulega hemolizie wewnątrznaczyniowej w warunkach fizjologicznych, a proces ten może znacznie nasilać się w przebiegu wielu chorób.

Kluczowa rola wątroby w usuwaniu erytrocytów i uwolnionej z nich hemoglobiny jest powszechnie uznawana. To wiedza podręcznikowa i niełatwo opisać tu nowe mechanizmy o podstawowym znaczeniu. Okazuje się jednak, że rola różnych typów komórek wątrobowych nie jest w pełni ustalona, a klasyczne schematy ilustrujące ich funkcje mogą być zbytnim uproszczeniem.

Praca Doktorantki była próbą zidentyfikowania komórek odpowiedzialnych za usuwanie przez wątrobę uwolnionej z erytrocytów hemoglobiny. Podjęcie się analizy tak podstawowej aktywności, która często uważana jest za dobrze poznaną, zasługuje na duże uznanie. Tym bardziej, że badania pozwoliły na uzyskanie wyników, które nie ograniczą się do potwierdzenia znanych zależności, lecz są nowatorskie. Wartościowym elementem pracy jest również prowadzenie badań nie tylko na modelach komórkowych i hodowlach *in-vitro* czy *ex-vivo*, ale również na modelach zwierzęcych, pozwalających na analizy zjawiska na poziomie całego organizmu.

Badania Doktorantki skupiały się na określeniu roli komórek sinusoidalnych śródbłonna wątroby (LSEC) w usuwaniu hemoglobiny i na

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

porównaniu ich znaczenia z aktywnością komórek Browicza-Kupffera. Pani mgr Zuzanna Sas prowadziła badania na myszach, analizując następnie *ex-vivo* pobrane od nich narządy, przede wszystkim wątrobę i śledzionę. W badaniach uwzględniała też komórki izolowane ze szpiku kostnego i śródbłónki aorty.

Realizacja projektu wymagała zastosowania przez Doktorantkę najważniejszych technik biologii molekularnej i komórkowej. Pani mgr Zuzanna Sas wykorzystywała między innymi cytometrię przepływową do fenotypowania komórek i detekcji hemoglobiny, sortowanie komórek w oparciu o cechy fenotypowe, mikroskopię fluorescencyjną i barwienia immunohistochemiczne oraz analizy ekspresji genów na poziomie mRNA z użyciem qRT-PCR. Na podkreślenie zasługują badania biodystrybucji z zastosowaniem znakowanej hemoglobiny, a zwłaszcza wykorzystanie zarówno znakowania fluorescencyjnego jak i radioizotopowego.

Najciekawsze moim zdaniem wyniki uzyskane przez Doktorantkę to pokazanie, że usuwanie starych erytrocytów i produktów hemolizy w wątrobie wiąże się ze specjalizacją komórkową. Zniszczone erytrocyty są fagocytowane przez komórki Browicza-Kupffera, natomiast za usuwanie uwolnionej z erytrocytów hemoglobiny odpowiedzialne są przede wszystkim komórki śródbłónki sinusoidalnego, wykorzystujące w tym celu makropinocytozę. Te obserwacje mają dużą wartość poznawczą, a rola LSEC w usuwaniu hemoglobiny zaczęła być doceniana dopiero ostatnio.

Rozprawa doktorska pani mgr Zuzanny Sas jest dość krótka i liczy 96 stron maszynopisu, w tym 24 rysunki i fotografie oraz 3 tabele. Cytowane piśmiennictwo to 107 pozycji. Rozprawa zawiera też kopie zgód komisji bioetycznych na wykonywanie badań na zwierzętach. Praca skomponowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: Wstęp, osobny rozdział przedstawiający Założenia i Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję oraz wyodrębnione w osobny rozdział Wnioski. Całość poprzedzona jest Spisem Treści, Spisem Rycin, Spisem Tabel, Wykazem Skrótów oraz Streszczeniem, i angielskim Abstraktem, a zakończona Bibliografią. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części są prawidłowe, a Spis Treści oraz Wykaz Skrótów są dobrze przygotowane i ułatwiają lekturę. Można się jedynie zastanawiać na celowości stosowania w opisach skrótów FCS i FBS, co



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowe 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
fax +48 12 664 6918
alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

sugeruje różnice między płodową surowicą „bydlęcą” a „cielęcą”, to jednak uwaga nie mająca znaczenia merytorycznego.

Streszczenie (podobnie jak angielskie Summary) jest napisane prawidłowo, dobrze uzasadnia i przedstawia ogólny cel badań, przybliża zastosowaną metodykę oraz jasno prezentuje wyniki i wnioski płynące z przeprowadzonych doświadczeń. Wnioskowanie nie budzi zastrzeżeń. Pewną nieścisłość stanowi jedynie stwierdzenie, że „wykazano, że LSEC nie posiadają na swojej powierzchni receptora CD163”, gdyż treść pracy wskazuje na analizy qRT-PCR (czyli ekspresji genu na poziomie mRNA) w sortowanych komórkach, bez badania obecności białka. Informacja o niewykrywalnym poziomie ekspresji genu byłaby precyzyjniejsza.

Liczący 16 stron Wstęp jest ciekawie napisany, a dobór treści i synteza wniosków płynących z różnych publikacji potwierdza dobre zrozumienie tematu przez Doktorantkę. Wstęp omawia najważniejsze zagadnienia związane z głównymi subpopulacjami komórek wątroby i jej architekturą, skupiając się na komórkach śródbłonna sinusoidalnego i komórkach Browicza-Kupffera. Charakteryzuje hemoglobinę i jej metabolizm, a zwłaszcza konsekwencje hemolizy, sporo uwagi poświęca też omówieniu makropinocytozy i jej regulacji przez kanoniczną ścieżkę sygnałową zależną od Wnt.

Tekst uzupełniony jest dobrymi schematami. Nieco brakuje mi natomiast szerszego i bardziej systematycznego omówienia pochodzenia LSEC, ich heterogenności fenotypowej i funkcjonalnej, a zwłaszcza obecności i braku markerów uważanych za typowe dla komórek śródbłonna. Ponieważ Autorka informuje o pochodzeniu nazwy, korzystne byłoby też dodanie informacji wyjaśniającej dlaczego komórki znane w literaturze anglojęzycznej jako Kupffer cells są określane (prawidłowo) jako komórki Browicza-Kupffera. Skoro wspomniana została rola Karla von Kupffera, powinna zostać wspomniana również rola Tadeusza Browicza. Prosiłabym również o nieco bliższe wyjaśnienie na ile synteza hemu i hemoglobiny zachodzi w erytrocytach (str. 26). Uwagi te mają charakter subiektywny i zakres tematyczny wybrany przez Doktorantkę może być uznany za prawidłowy, choć miejscami opis jest zbyt powierzchowny.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918
alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

Generalnie, Wstęp dobrze wprowadza w zagadnienia będące głównym tematem pracy i dobrze uzasadnia celowość badań, co jest najważniejszym ocenianym kryterium. Bardzo ciekawie napisany jest fragment dotyczący usuwania starzejących się erytrocytów na drodze erytrofagocytozy lub lizy. Dobrze scharakteryzowane są też szlaki endocytozy i ich regulacja. Słabszą stroną jest poprawność językowa i staranność edycyjna, ale to nie ma znaczenia merytorycznego.

Podstawowy cel badań jest jasno sformułowany i dobrze uzasadniony z precyzyjnie wskazanymi celami szczegółowymi. Warto podkreślić, że punktem wyjścia zaplanowanych badań były wcześniejsze wyniki własne macierzystej grupy badawczej, które trudno było wyjaśnić zgodnie z najczęściej przyjmowanym modelem. To bardzo racjonalne i dojrzałe podejście.

Doktorantka na 15 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są prawidłowe i mogą wystarczyć do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Przydatne jest też zestawienie sekwencji stosowanych primerów oraz podanie producentów wykorzystywanych przeciwciał. Nie jest dla mnie jasne czy, a jeśli tak to w jaki sposób sprawdzano czystość populacji komórek uzyskanych po separacji frakcji parenchymalnej i nieparenchymalnej (str. 39). Przy analizie śródbłonnków śledzionowych i szpikowych można byłoby też rozważyć uwzględnienie Stab2 jako dodatkowego markera. Generalnie, uważam że w przyszłych analizach warto byłoby uwzględniać heterogenność komórek śródbłonkowych i możliwość tracenia części frakcji przy standardowych barwieniach. Dotyczy to np. markera CD31 i analizy komórek śródbłonna sinusoidalnego szpiku.

Opis hodowli komórek jest prawidłowy i wystarczający biorąc pod uwagę, że dotyczy standardowych procedur, choć lepiej byłoby np. podawać rzeczywiste stężenie antybiotyków (np. str. 44) niż rozcieńczenie komercyjnie dostępnej mieszaniny. Przy opisie barwień immunohistochemicznych pewne wątpliwości może budzić wykorzystanie obecności CD146 jako jedynego markera komórek śródbłonna (str. 46). Czy Doktorantka brała pod uwagę, że jest to marker obecny również np. na pericytach? Ze względów stylistycznych sugerowałabym konsekwentne używanie czasowników w aspekcie niedokonanym gdyż aspekt dokonany sugeruje jednokrotność wykonanej czynności (np. sprawdzano v. sprawdzono). To jednak jedynie uwaga o



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

charakterze edytorskim. Dobrą praktyką jest konsekwentne wskazywanie przez Doktorantkę, które procedury zostały wykonane we współpracy i wymienianie współpracowników.

Wyniki (zajmujące 28 stron) są jasno opisane i zilustrowane odpowiednimi wykresami oraz udokumentowane zdjęciami. Co ważne, Doktorantka dąży do opisanie doświadczeń tak, by widać było logiczne związki między kolejnymi etapami prac. Ułatwia to śledzenie toku rozumowania Autorki i zrozumienie zasadności kolejnych kroków. Miejscami jednak kolejność opisu nie jest optymalna – lepsze byłoby w pierwszej kolejności pokazanie skuteczności modelu (np. usuwania makrofagów po podaniu kwasu kladronowego), a potem opisanie skutków usunięcia na biodystrybucję hemoglobiny. Opis lokalizacji fluorescencyjnie znakowanej hemoglobiny w śródbłonkach z różnych narządów pojawia się nieoczekiwanie w podrozdziale opisującym detekcję hemoglobiny znakowanej radioizotopowo.

Pierwsza część opisu Wyników poświęcona jest analizie biodystrybucji hemoglobiny u myszy u których usunięto makrofagi. Procedura była skuteczna i specyficzna, co jest dobrze udokumentowane. Bardzo dobrym podejściem było wykorzystanie dwóch metod znakowania hemoglobiny, a co za tym idzie niezależnego i odmiennego dla obu metod sposobu detekcji. Doktorantka wykonała znakowanie fluorescencyjne i radioizotopowe. Obie metody dały podobne wyniki, co zdecydowanie zwiększa wiarygodność konkluzji. Warto byłoby natomiast rozważyć dodatkowe kontrole: narządy pochodzące od myszy którym nie podano znakowanej fluorescencyjnie hemoglobiny oraz podanie znacznika (AF750) niezwiązanego z białkiem. Interesującą obserwacją jest wzrost intensywności sygnału w nerkach u myszy pozbawionych makrofagów. Podobną zależność widać przy znakowaniu radioizotopowym. Jak Doktorantka interpretuje ten wynik?

W kolejnym etapie badań Doktorantka charakteryzowała populacje komórek wątroby pobierające hemoglobinę, porównując między innymi dwa punkty czasowe oraz wykorzystując hodowle *ex-vivo* komórek wątroby. Dodatkowo wykonała analizy immunocytochemiczne skrawków wątroby. Jak Doktorantka uzasadnia użycie hodowli mieszanej komórek (str. 60)? Zastosowana strategia jest poprawna, wydaje się jednak, że większe możliwości interpretacji ilościowej dałyby hodowle sortowanych subpopulacji.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

Warto byłoby także rozważyć pokazanie oprócz złożenia kolorów również zdjęć z poszczególnymi barwieniami (Ryc. 11). Czy w tym doświadczeniu rzeczywiście wykorzystywano hemoglobinę znakowaną AF647, skoro sygnał na zdjęciu opisany jest jako pochodzący z AF750?

Kolejny etap badań to poszukiwania mechanizmu odpowiedzialnego za biodystrybucję hemoglobiny i bezpośrednie porównania zaangażowania śródbłónka wątroby i śródbłónka śledziony. Wyniki potwierdziły znaczenie LSEC. Doktorantka pokazała również, że pobieranie hemoglobiny przez badane populacje komórek jest efektywniejsze niż pobieranie kompleksów hemoglobina-haptoglobina. Ponadto, w odpowiedzi na pobranie hemoglobiny w komórkach dochodziło do indukcji genów związanych z metabolizmem hemu i indukcją odpowiedzi zapalnej. Przeprowadzone analizy wskazały również, że LSEC pobierają nie tylko hemoglobinę, ale również albuminę.

W ostatnim cyklu doświadczeń Doktorantka scharakteryzowała różnicę funkcjonalną między LSEC (pobierającymi hemoglobinę na drodze najprawdopodobniej makropinocytozy) i komórkami Browicza-Kupffera odpowiedzialnymi za fagocytozę uszkodzonych erytrocytów. To bardzo ciekawa część badań.

Przy lekturze rozdziału Wyniki nasunęły mi się jeszcze następujące pytania i uwagi:

- Str. 52, Ryc. 6A: Przy zdjęciu pokazującym sygnał fluorescencyjny z narządów powinna znaleźć się skala wyjaśniająca znaczenie kolorów.

- Str. 55, Ryc. 8B: W jakiś sposób wykazano, że sygnał pochodzący z AF750 wykrywany z wykorzystaniem cytometrii przepływowej w śródbłónkach jest sygnałem pochodzącym z wnętrza komórki?

- Str. 57, Ryc. 9A: Jak Doktorantka klasyfikuje komórki wątroby o fenotypie CD45⁺ F4/80⁺ CD146⁺ STAB2⁺ ?

- Str. 60, Ryc. 11: Czy skala na rysunku przedstawia rzeczywiście odcinek 10 μm ? Komórki LSEC są bardzo małe, ale skala sugeruje że część z nich ma średnicę mniejszą niż 5 μm .

- Str. 66, Ryc. 15: czy różnica w intensywności fluorescencji obserwowana w komórkach hodowanych w obecności hemoglobiny lub kompleksów hemoglobina-haptoglobina może wynikać ze słabszego wyznakowania kompleksów AF750?

Dyskusja zajmuje 9 stron i skupia się przede wszystkim na podsumowaniu uzyskanych wyników oraz ich omówieniu w świetle wcześniej opublikowanych prac. Porządkuje uzyskane dane i podkreśla najważniejsze wnioski. Wzbogaca też interpretację wyników i odnosi je nie tylko do fizjologii, ale również do chorób zwiększających ryzyko hemolizy. Przekonujący i ciekawy jest zwłaszcza fragment podsumowujący znacznie receptora CD163 i możliwe różnice między komórkami ludzkimi a mysimi. Byłabym jedynie ostrożna przy określaniu komórek HEK293 jako komórek nabłonkowych (str. 82).

Doktorantka omawia również w Dyskusji znaczenie ekspresji oksygenazy hemowej-1 wskazując na możliwy stres oksydacyjny przyczyniający się do indukcji tego genu. Nieco brakuje mi w tym kontekście odniesienia się do możliwej roli LSEC w gospodarce żelazem odzyskiwanym przy udziale HO-1 z pobranego wraz z hemoglobina hemu. To jednak nie jest zarzut w stosunku do Doktorantki, a raczej zaproszenie do wyrażenia opinii na ten temat np. podczas obrony.

Wnioski wyodrębnione w osobny podrozdział są jasno sformułowane i uzasadnione przedstawionymi wynikami badań. Można przypuszczać, że praca będzie stanowić punkt wyjścia do dodatkowych doświadczeń, wzmacniających proponowane wnioskowanie.

Pod względem edytorskim rozprawa doktorska przygotowana jest w sposób akceptowalny, nie wpływający na wartość merytoryczną. Tekst zawiera niewiele błędów literowych, natomiast dużo jest w nim błędów interpunkcyjnych i stylistycznych. Napisany jest komunikatywnym językiem, miejscami jednak sprawiającym wrażenie dosłownego tłumaczenia z publikacji anglojęzycznych. To jednak nie wpływa na ocenę jakości i interpretacji przeprowadzonych doświadczeń.

Podsumowując, badania opisane przez Doktorantkę dotyczą bardzo ważnych zagadnień, o dużym znaczeniu dla zrozumienia podstawowej fizjologii oraz lepszego wglądu w patofizjologię chorób związanych z hemolizą. Badania być może nie dostarczają ostatecznego, silnego dowodu na mechanizm działania i wyjątkowość komórek sinusoidalnych śródbłona wątroby, ale stanowią bardzo silną przesłankę wspierającą zaproponowane wnioski. Dzięki wykorzystaniu dobrze zaplanowanych układów



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
fax +48 12 664 6918
alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

doświadczalnych badania pozwoliły na uzyskanie wartościowych wyników, które na pewno nie mają duży walor poznawczy.

Uważam, że Doktorantka prawidłowo zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa 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). W związku z tym proszę wysoką Radę Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Zuzanny Sas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



**UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE**

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl