

**mgr Zuzanna Sas**

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

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Tomasz Rygiel

Zakład Immunologii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

## Słowa kluczowe

hemoliza, hemoglobina, komórki śródbłonna zatok wątroby, komórki Browicza-Kupffera

## Key words

hemolysis, hemoglobin, Liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells

## Nazwy i numery projektów badawczych, z których sfinansowano badania

Grant TEAM TECH finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, nr. TEAMTECH/2016-1/8, pt. „**Innovative cell-based, targeted drug delivery method to the tumour**”. [kierownik projektu Tomasz Rygiel]



*Dziękuję mojemu Promotorowi dr. hab. Tomaszowi Ryglowi za przeprowadzenie przez studia doktoranckie oraz skompletowanie najlepszego zespołu naukowego w jakim miałam przyjemność pracować.*

*Dziękuję Gabrysi, Zosi, Kasi, Oli, Whitney i Marcinowi za codzienne porady i pomoc w zdobywaniu nowych umiejętności.*

*Szczególne podziękowania składam Agacie, za wspaniałą atmosferę w pracy, zrozumienie bez słów i za to, że zawsze mogę na Niej polegać.*

*Pani Uli Mecnarowskiej dziękuję za zarażenie pasją i motywację oraz wprowadzenie w zawiły świat biologii.*



## Spis treści

Spis rycin.....	9
Spis tabel .....	11
Wykaz stosowanych skrótów .....	12
Streszczenie w języku polskim.....	15
Streszczenie w języku angielskim .....	17
1. Wstęp .....	19
1.1 Budowa mikroskopowa wątroby.....	19
1.1.1 LSEC .....	22
1.1.2 Komórki Browicza-Kupffera .....	24
1.2 Hemoglobina .....	25
1.2.1 Hemoliza i metabolizm wolnej Hb.....	27
1.3 Makropinocytoza.....	32
1.3.1 Wpływ kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt na makropinocytozę. ....	33
2. Założenia i cele pracy.....	35
3. Materiały i metody .....	36
3.1 Zwierzęta doświadczalne.....	36
3.2 Izolacja Hb .....	36
3.3 Koniugacja białek z fluorochromem.....	37
3.4 Kompleksowanie Hb i Hp.....	37
3.5 Iniekcje.....	38
3.5.1 Iniekcje dożylne .....	38
3.5.2 Iniekcje dootrzewnowe .....	38
3.6 Izolacja komórek z narządów .....	38
3.6.1 Izolacja komórek nieparenchymalnych i hepatocytów z wątroby .....	38
3.6.2 Izolacja komórek śledziony.....	39
3.6.3 Izolacja komórek szpiku kostnego .....	39
3.6.4 Izolacja komórek aorty .....	40
3.7. Cytometria przepływowa .....	40
3.8 Hodowle pierwotne komórek wątroby .....	44
3.8.1 Inkubacja komórek ze związkami drobnocząsteczkowymi .....	44
3.9 Przygotowanie RBC poddanych szokowi cieplnemu .....	45
3.10 Immunofluorescencja.....	46
3.10.1 Zbadanie pobierania Hb <i>in vitro</i> w hodowli pierwotnych komórek wątroby .....	46
3.10.2 Zbadanie pobierania Hb przez komórki LSEC i KC za pomocą barwienia immunohistochemicznego .....	46

3.10.3	Obrazowanie makropinosomów za pomocą mikroskopu konfokalnego.....	47
3.11	Pomiar ekspresji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR ) .....	48
3.12	Pomiar biodystrybucji Hb-AF750 w organach <i>ex vivo</i> .....	49
3.13	Pomiar biodystrybucji Hb znakowanej <sup>131</sup> I.....	49
3.13.1	Przygotowanie <sup>131</sup> I -Hb .....	49
3.13.2	Podanie i pomiar aktywności <sup>131</sup> I -Hb.....	50
3.14	Analiza statystyczna .....	50
4.	Wyniki .....	51
4.1	Zbadanie biodystrybucji Hb u myszy po usunięciu makrofagów .....	51
4.1.1	Zbadanie biodystrybucji Hb w komórkach śródbłonnków zatokowych w różnych organach .....	54
4.2	Charakterystyka populacji komórek wątroby odpowiedzialnych za wychwyt Hb.....	56
4.3	Zbadanie pobierania Hb w czasie przez główne populacje komórek w wątrobie .....	58
4.4	Zbadanie wychwytu Hb <i>in vitro</i> w hodowli pierwotnych komórek wątroby.....	60
4.5	Zbadanie pobierania Hb przez komórki LSEC i KC za pomocą barwienia immunohistochemicznego.....	61
4.6	Zbadanie ekspresji receptora CD163 w LSEC i KC.....	63
4.7	Zbadanie wpływu obecności Hp na pobieranie Hb przez komórki LSEC i KC.....	64
4.8	Zbadanie efektu wolnej Hb na homeostazę wątroby .....	66
4.9	Zbadanie efektywności pobierania Hb przez komórki śródbłonka i makrofagi w wątrobie i śledzionie w zależności od dawki .....	68
4.10	Porównanie działania endogennej i egzogennej Hb na profil ekspresji genu <i>Hmox-1</i> w komórkach LSEC i KC.....	70
4.11	Specyficzność wychwytu Hb przez LSEC .....	72
4.12	Porównanie wychwytu Hb i RBC poddanych stresowi cieplnemu.....	73
4.13	Zbadanie pobierania Hb przez LSEC za pomocą makropinocytozy.....	74
5.	Dyskusja .....	79
5.1	Biodystrybucja wolnej Hb w organach.....	80
5.2	Komórki odpowiedzialne za wychwyt wolnej Hb .....	81
5.3	Śródbłonki .....	82
5.4	Makropinocytoza .....	83
5.5	Choroby hemolityczne .....	85
6.	Wnioski.....	88
	Bibliografia .....	89



## Spis rycin

Rycina 1. Budowa zrazika i zatoki wątrobowej.

Rycina 2. Receptory powierzchniowe LSEC.

Rycina 3. Systemy detoksykacyjne wolnej Hb.

Rycina 4. Regulacja makropinocytozy przez kanoniczną ścieżkę sygnałową Wnt.

Rycina 5. Strategia bramkowania populacji komórek wątroby, szpiku kostnego, śledziony i aorty.

Rycina 6. Dystrybucja tkankowa podanej dożylnie Hb u myszy po deplecji makrofagów.

Rycina 7. Weryfikacja deplecji makrofagów w wątrobie przy użyciu liposomów kwasu kłodronowego.

Rycina 8. Wychwył Hb przez organy posiadające komórki śródbłonka zatok.

Rycina 9. Wychwył Hb przez poszczególne populacje komórek wątroby.

Rycina 10. Kinetyka pobierania Hb przez główne populacje komórek wątroby.

Rycina 11. Wychwył Hb przez komórki LSEC *ex vitro* w hodowli pierwotnych komórek wątroby.

Rycina 12. Pobieranie Hb przez komórki LSEC i KC.

Rycina 13. Poziom ekspresji genu *Cd163* w komórkach LSEC i KC.

Rycina 14. Porównanie pobierania Hb i kompleksu Hb:Hp przez komórki LSEC i KC *in vivo*.

Rycina 15. Porównanie pobierania Hb i kompleksu Hb:Hp przez komórki LSEC i KC *in vitro*.

Rycina 16. Kinetyka zmian w homeostazie wątroby w odpowiedzi na podanie wolnej Hb.

Rycina 17. Efektywność pobierania Hb przez komórki śródbłonka i makrofagi tkankowe w wątrobie i śledzionie, w odniesieniu do podanej dawki.

Rycina 18. Poziom ekspresji genu *Hmox-1* po chemicznej indukcji niedokrwistości przy użyciu PHZ.

Rycina 19. Indukcja lizy erytrocytów po podaniu PHZ.

Rycina 20. Wychwyt Hb i BSA przez komórki LSEC i KC.

Rycina 21. Wychwyt Hb i zniszczonych erytrocytów przez komórki LSEC i KC.

Rycina 22. Wpływ inhibitorów endocytozy i makropinocytozy na pobieranie Hb zbadany za pomocą cytometrii przepływowej.

Rycina 23. Wpływ inhibitora makropinocytozy na pobieranie Hb zobrazowany za pomocą mikroskopii konfokalnej.

Rycina 24. Pobieranie Hb za pomocą makropinocytozy.

## Spis tabel

Tabela 1. Inhibitory wykorzystane w hodowli komórek.

Tabela 2. Startery wykorzystane w reakcji qPCR.

Tabela 3. Zestawienie grup doświadczalnych.

## Wykaz stosowanych skrótów

AF	<i>Alexa Fluor</i>
AGE's	<i>advanced glycation end products</i> - końcowe produkty glikacji białek
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> -surowicza albumina wołowa
CD	<i>cluster of differentiation</i> - antygen różnicowania komórkowego
cDNA	<i>complementary DNA</i> - komplementarny DNA
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> - chomicze komórki epitelialne jajnika
CK	<i>casein kinase</i> - kinaza kazeinowa
CPZ	<i>chlorpromazine</i> - chlorpromazyna
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i> - struktury molekularne związane z uszkodzeniem
EEA	<i>early endosome antigen</i> -antygen wczesnych endosomów
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - płodowa surowica bydlęca
FSC	<i>forward scatter</i> - rozproszenie czołowe
FCS	<i>fetal calf serum</i> - płodowa surowica cielęca
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i> - kinaza syntazy glikogenu
Hb	hemoglobina
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> - roztwór soli Hanks'a
HBV	<i>hepatitis B virus</i> - wirus zapalenia wątroby typu B
HEK	<i>human embryonic kidney</i> - ludzkie embrionalne komórki nerki
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> - wątrobowy czynnik wzrostu
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> - ludzki wirus niedoboru odporności
HO-1	<i>heme oxygenase-1</i> - oksygenaza hemowa-1
Hp	haptoglobina
HSC	<i>hepatic stellate cells</i> - komórki gwiaździste wątroby

Hx	hemopeksyna
KC	<i>Kupffer cells</i> - komórki Kupffera
LAT	latrankulina
LDL	<i>low density lipoprotein</i> - lipoproteina o niskiej gęstości
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> - receptor LDL
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i> - sinusoidalne komórki śródbłonna wątroby
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> - średnia intensywność fluorescencji
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> - główny układ zgodności tkankowej
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i> - graniczna masa cząsteczkowa
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide</i> - N- hydroksysukcynimid
NO	<i>nitric oxide</i> - tlenek azotu
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i> - wzorce molekularne związane z patogenami
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> - płytkopochodny czynnik wzrostu
PFA	paraformaldehyd
PHZ	<i>phenylhydrazine</i> - fenylohydrazyna
PRMT	<i>protein arginine methyltransferase</i> - białkową etylotransferazę argininową
RBC	<i>red blood cells</i> - erytrocyty
RCF	<i>relative centrifugal force</i> - względna siła odśrodkowa
RNA	kwasy rybonukleinowe
ROI	<i>region of interest</i> - obszar zainteresowania
RPM	<i>red pulp macrophages</i> - makrofagi miazgi czerwonej
SD	<i>standard deviation</i> - odchylenie standardowe

SSC	<i>side scatter</i> - rozproszenie boczne
Stab	stabilina
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor family</i> - czynniki transkrypcyjne TCF/LEF
TLC	<i>thin layer-chromatography</i> - chromatografia cienkowarstwowa
TLR	<i>Toll-like receptor</i> - receptor Toll-podobny

## Streszczenie w języku polskim

Hemoglobina (Hb) to białko znajdujące się w erytrocytach, którego główną funkcją jest transport tlenu i dwutlenku węgla w organizmie. Kiedy Hb zostaje uwolniona z erytrocytów do krążenia lub do otaczających tkanek, może wykazywać właściwości cytotoksyczne, prozapalne i prooksydacyjne. Znaczące ilości Hb są uwalniane podczas fizjologicznej lizy erytrocytów, ponadto nadmierna hemoliza towarzyszy wielu wrodzonym i nabytym chorobom. Fizjologicznie do 10% erytrocytów może ulegać lizie w krążeniu, zwłaszcza w śledzionie, gdzie odbywa się usuwanie starzejących się erytrocytów. Kanonicznie, wolna Hb jest wychwytywana przez osoczowe białko ostrej fazy - haptoglobinę. Kompleksy Hb-haptoglobina są wiązane przez receptor CD163 obecny na makrofagach śledziony i wątroby, gdzie Hb jest degradowana. Jednak warunki hemolityczne mogą prowadzić do wyczerpania populacji tych makrofagów, a także niedoboru haptoglobiny, co sugeruje istnienie alternatywnych mechanizmów usuwania Hb. Dotychczas nie zostały opisane inne sposoby usuwania wolnej Hb.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie i zbadanie nowej drogi wychwytu wolnej Hb w wątrobie, niezależnej od haptoglobiny i receptora CD163. Badania przeprowadzono na modelu mysim oraz na hodowlach komórek pierwotnych uzyskanych z mysiej wątroby. Aby jak najlepiej naśladować warunki fizjologiczne, w eksperymentach wykorzystano Hb izolowaną z mysiej krwi. Losy Hb i jej biodystrybucję w organizmie śledzono za pośrednictwem znakowania fluorescencyjnego z wykorzystaniem barwnika Alexa Fluor lub znakowania izotopem jodu.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem podanych dożylnie liposomów kwasu kłodronowego i fluorescencyjnie znakowanej Hb wykazały, że Hb akumuluje się głównie w wątrobie niezależnie od obecności makrofagów. Za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej zaobserwowano, że sinusoidalne komórki śródbłonka wątroby (LSEC) są główną populacją komórek wątroby odpowiedzialną za wychwyt wolnej Hb, zarówno w niskich, jak i wysokich stężeniach. Co ciekawe, wykazano, że LSEC nie posiadają na swojej powierzchni receptora CD163 odpowiedzialnego za wychwyt kompleksu Hb-haptoglobina, a wolna Hb była wychwytywana efektywniej niż Hb związana z haptoglobiną. Barwienie pierwotnych LSEC z wykorzystaniem markera wczesnych endosomów (EEA1) i fluorescencyjnie

znakowanej Hb wykazało obecność Hb w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach o wielkości charakterystycznej dla makropinosomów. Zaobserwowano także kolokalizację Hb i dekstranu będącego markerem fazy płynnej, która ulega wychwytowi w makropinosomach. Dodatkowo wykazano, że inhibitor makropinocytozy (EIPA) spowodował zahamowanie pobierania Hb przez LSEC, w przeciwieństwie do inhibitora endocytozy (CPZ). Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach fizjologicznych LSEC są główną populacją komórek odpowiedzialną za wychwyt wolnej Hb, którą pobierają za pomocą makropinocytozy.



## Streszczenie w języku angielskim

### **Identification of the novel route for hemoglobin clearance in the liver.**

Hemoglobin (Hb) is a protein found in red blood cells that transports oxygen and carbon dioxide throughout the body. When released from erythrocytes into the circulation or surrounding tissues, Hb can exhibit cytotoxic, pro-inflammatory and pro-oxidative properties. Some amounts of Hb are released during the physiological lysis of erythrocytes, and excessive hemolysis accompanies many congenital and acquired diseases. Physiologically, up to 10% of erythrocytes can be lysed in the circulation, especially in the spleen where the removal of senescent erythrocytes takes place. Canonically, free Hb is bound by the plasma acute-phase protein- haptoglobin. Hb- haptoglobin complexes are bound by the CD163 receptor present on spleen and liver macrophages, where Hb is degraded. However, hemolytic conditions can lead to saturation of these mechanisms including macrophages and haptoglobin, suggesting alternative mechanisms for Hb clearance. To date, no other mechanisms of removing free Hb have been described.

The aim of this study was to identify and investigate a novel pathway of free Hb uptake in the liver, that is independent of haptoglobin and the CD163 receptor. The study was performed in a mouse model and in primary cell cultures obtained from mouse liver. In the experiments, we used Hb isolated from mouse blood to mimic physiological conditions. To track Hb in the body, the protein was fluorescently labeled with Alexa Fluor or an iodine isotope.

Studies using intravenous administration of clodronic acid liposomes, which depletes tissue macrophages, and fluorescently labeled Hb have shown that Hb accumulates primarily in the liver, regardless of the presence of macrophages. Using flow cytometry and confocal microscopy, liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) were observed to be the major liver cells population responsible for the uptake of free Hb at both low and high concentrations. Interestingly, it was shown that LSECs do not have the CD163 receptor on their surface, and that free Hb was captured more effectively than the Hb-haptoglobin complex. Staining of primary LSECs with the early endosome marker (EEA1) and fluorescently labeled Hb showed the presence of Hb in macropinosome-sized

intracellular vesicles. Co-localization of Hb and dextran, a marker of the liquid phase, which is taken up in macropinosomes, was also observed. In addition, the macropinocytosis inhibitor (EIPA) was shown to inhibit Hb uptake by LSECs, in contrast to the endocytosis inhibitor (CPZ). The obtained results indicate that under physiological conditions LSECs are the major liver cell population responsible for the uptake of free Hb, which they sequester by macropinocytosis.

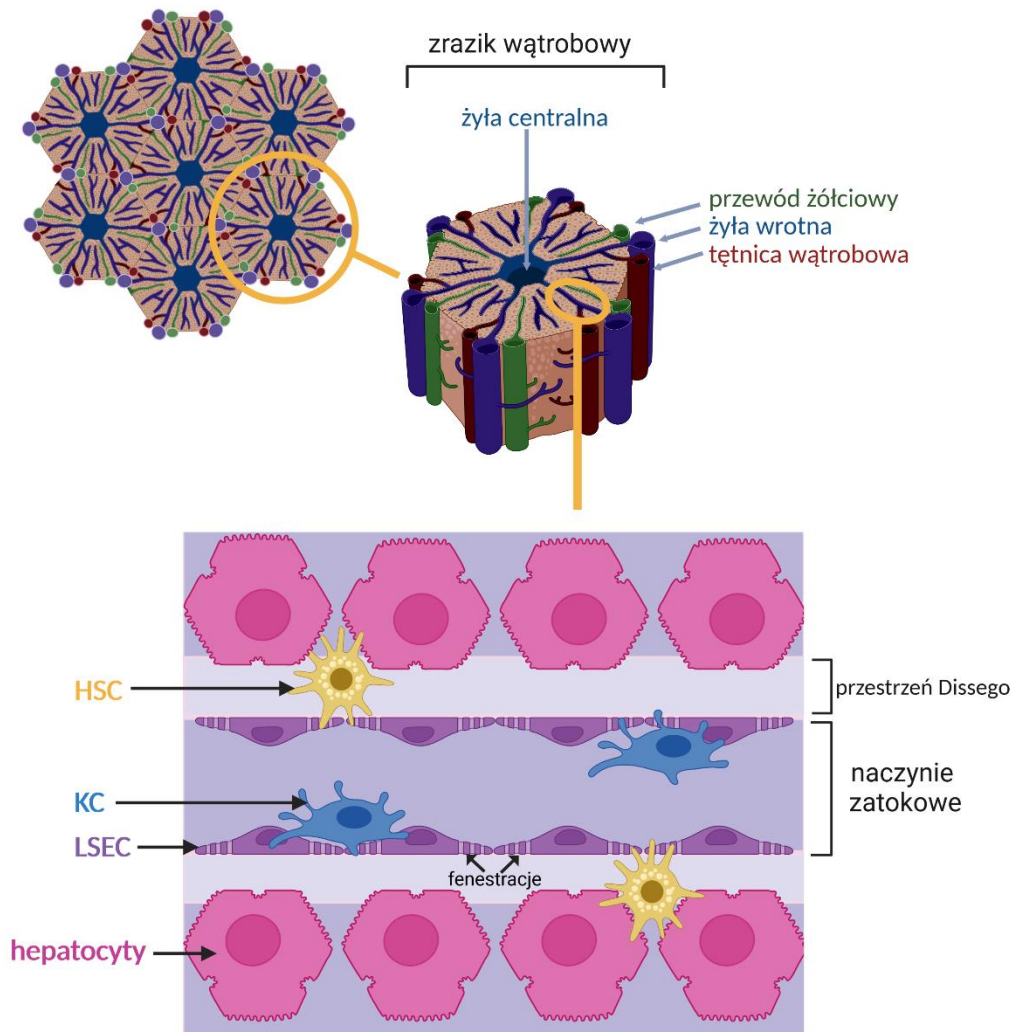
# 1. Wstęp

## 1.1 Budowa mikroskopowa wątroby

Wątroba jest organem o charakterze gruczołowym, który odgrywa integralną rolę w realizacji podstawowych funkcji biologicznych, takich jak detoksykacja organizmu oraz synteza białek i substancji biochemicznych kluczowych dla procesów trawienia i wzrostu. Jego dodatkowe funkcje w kontekście metabolizmu obejmują monitorowanie gromadzenia glikogenu, katabolizm erytrocytów oraz produkcję hormonów [1]. Różnicowanie komórek wątroby umożliwia wyodrębnienie dwóch podstawowych typów: komórki parenchymalne, zwane hepatocytami oraz komórki nieparenchymalne, do których zalicza się: komórki Browicza-Kupffera (ang. *Kupffer cells*, KC), sinusoidalne komórki śródbłonna wątroby (ang. *liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC), komórki gwiaździste (ang. *hepatic stellate cells*, HSC), cholangiocyty, komórki progenitorowe wątroby oraz komórki immunologiczne (limfocyty, monocyty, neutrofile, komórki dendrytyczne) [2].

Hepatocyty stanowią około 80% ogólnej populacji komórek wątroby. Typowo układają się w pojedyncze pasma komórek, które wychodzą promieniście od żyły centralnej, formując zrazik wątrobowy (łac. *lobulus hepatis*) (Ryc. 1). W strukturze hepatocytu można wyróżnić biegun naczyniowy, skierowany w stronę naczynia zatokowego, oraz biegun żółciowy, formujący błonę kanalika żółciowego [3]. Hepatocyty są odpowiedzialne za procesy takie jak: metabolizm węglowodanów, lipidów i białek, detoksykacja i aktywacja komórek odpornościowych, które mają na celu utrzymanie homeostazy wątroby. Między innymi, hepatocyty konstytutywnie wytwarzają i wydzielają białka układu dopełniacza, utrzymują ich odpowiednio wysokie stężenie w surowicy, co przyczynia się do ich znaczącej roli w odporności nieswoistej [4].

Naczynia zatokowe wątroby są wyścielone nieparenchymalnymi komórkami LSEC, pomiędzy którymi zlokalizowane są komórki KC, pełniące rolę rezydentnych makrofagów. Komórki gwiaździste rozmieszczone są w przestrzeni Dissego, będącej przestrzenią pomiędzy śródbłonkiem i mikroosmkami hepatocytów wypełnioną osoczem (Ryc. 1). W stanie fizjologicznym, komórki gwiaździste są uśpione, natomiast w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki, ulegają aktywacji i angażują się w proces włóknienia [2].



**Rycina 1. Budowa zrazika i zatoki wątrobowej.** Wątroba charakteryzuje się budową zrazikową. Zraziki zbudowane są z promieniście ułożonych hepatocytów (kolor różowy). Na każdym wierzchołku zrazika znajduje się tzw. triada wątrobowa, w której skład wchodzi: przewód żółciowy (kolor zielony), żyła wrotna (kolor niebieski) i tętnica wątrobowa (kolor bordowy). Krew spływa z żyły wrotnej i tętnicy wątrobowej przez naczynia zatokowe do żyły centralnej, która przebiega przez środek zrazika (kolor niebieski). Naczynie zatokowe wyścielone jest płaskimi komórkami LSEC zawierającymi pory-tzw. fenestracje (kolor fioletowy). Pomiędzy komórkami LSEC znajdują się KC (kolor niebieski), których wypustki mogą penetrować do przestrzeni Dissego. W przestrzeni Dissego, wypełnionej osoczem, znajdują się nieaktywne komórki gwiazdziste (kolor żółty).

Każdy z płatów wątroby składa się z sześciokątnych zrazików. Na każdym wierzchołku zrazika umiejscowiona jest triada wątrobowa, składająca się z żyły wrotnej, przewodu żółciowego i tętnicy wątrobowej (Ryc. 1). W zraziku wątrobowym, krew bogata w składniki odżywcze pochodzące z żyły wrotnej miesza się z utlenowaną krwią z tętnicy wątrobowej. Następnie przepływa przez rozgałęzioną sieć włosowatych naczyń

zatokowych (tworzących kapilarną sieć naczyń wątroby) między beleczkami hepatocytów, a później przez żyłę centralną i żyłę wątrobową, po czym uchodzi do żyły głównej [5].

Wątroba charakteryzuje się podwójnym systemem ukrwienia: prawa i lewa tętnica wątrobowa transportują natlenowaną krew do wątroby, podczas gdy żyła wrotna przenosi krew żylną z przewodu pokarmowego do wątroby. Krew żylna z przewodu pokarmowego s pływa do żył kręzkowych górnej i dolnej; te dwa naczynia łączą się następnie z żyłą śledzionową tuż za szyjką trzustki, tworząc żyłę wrotną. Ta z kolei dzieli się na prawą i lewą gałąź, z których każda zaopatruje mniej więcej połowę wątroby [6].

Unaczynienie wątroby charakteryzuje się nietypowym wzorcem w porównaniu do innych narządów, wynikającym z jednoczesnego dopływu krwi tętniczej i żylniej. Krew natlenowana, docierająca bezpośrednio z aorty przez tętnicę wątrobową stanowi jedynie 25% całości napływającej krwi. Pozostałe 75% to krew częściowo odtlenowana, bogata w składniki odżywcze pochodzące z różnych narządów układu pokarmowego, dostarczane przez żyłę wrotną [7]. Ta mieszanina krwi przepływa przez zatoki wątrobowe, przemieszczając się wzdłuż linii hepatocytów. Charakterystyczne ułożenie hepatocytów wokół żyły centralnej ułatwia drenaż przefiltrowanej i modyfikowanej krwi do żyły wątrobowej i ostatecznie do żyły głównej dolnej. Istotne jest to, że taka organizacja sprawia, że hepatocyty są jednymi z pierwszych komórek, które mają kontakt z substancjami wchłanianymi przez jelita, niezależnie od ich wartości odżywczej czy toksyczności [6].

Wątroba pełni kluczową rolę w mechanizmach obronnych organizmu. Znajdująca się w niej rozległa sieć naczyń włosowatych zawiera najskuteczniejszy system komórek zmiatających w organizmie, do którego należą KC (największy rezerwuuar makrofagów rezydujących w organizmie) i komórki LSEC. Przez dekady dominowało przekonanie, że KC znajdujące się w świetle zatok, są jedynymi komórkami wątroby odpowiedzialnymi za usuwanie materiału krwiopochodnego [8]. Jednakże, seria badań przeprowadzonych w latach 80. i 90. podważyła ten pogląd, wskazując, że wiele fizjologicznych makrocząsteczek i koloidów jest usuwanych głównie przez LSEC, a jedynie w niewielkim stopniu przez KC [9] [10]. Obecnie przyjmuje się, że zarówno LSEC jak i KC razem tworzą wątrobowy system zmiatający, przy czym LSEC są przystosowane do endocytozy nanocząstek (< 200 nm), koloidów i makrocząsteczek za pośrednictwem

klatryny, a KC są odpowiedzialne za eliminację większych składników [11]. Odkrycie podziału funkcji oczyszczania krwi pomiędzy tymi komórkami sugeruje, że LSEC są wysoce wyspecjalizowanym śródbłonkiem o cechach wspólnych z KC, zarówno na płaszczyźnie funkcjonalnej, jak i molekularnej [12].

### 1.1.1 LSEC

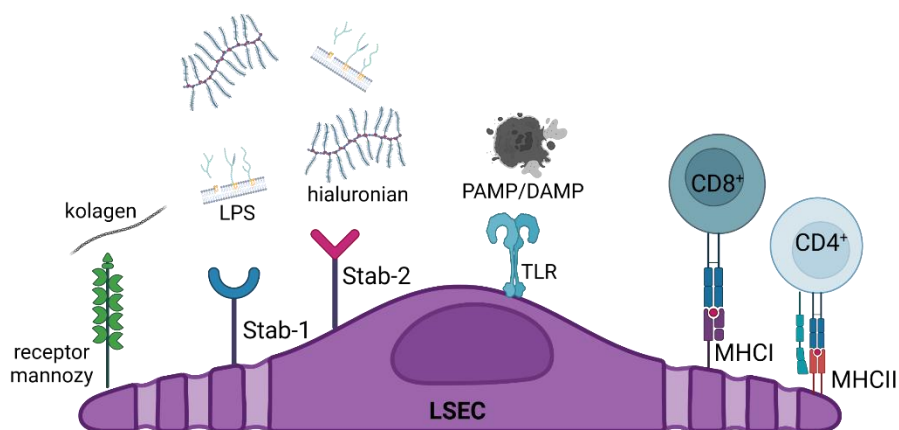
Sinusoidy to specyficzne naczynia zatokowe o średnicy 5-10  $\mu\text{m}$ , które są wyścielone komórkami śródbłonka zatok wątroby (LSEC). Dzięki obecności transbłonowych porów nazywanych fenestracjami (średnica od 50 do 200 nm), tworzą swoiste sito umożliwiające transport substancji pomiędzy naczyniem a hepatocytami [13]. Zidentyfikowano dwie populacje komórek prekursorowych dla LSEC: komórki progenitorowe pochodzące ze szpiku kostnego, które są rekrutowane do wątroby po urazie lub częściowej hepatektomii, oraz rezydentne komórki progenitorowe, odpowiedzialne za prawidłowe różnicowanie się LSEC, zarówno w zdrowej jak i uszkodzonej tkance [14][15]. LSEC cechują się unikalnością pod względem morfologicznym i funkcjonalnym. Jedną z istotnych różnic w odróżnieniu od innych komórek śródbłonka jest ekspresja białka CD45 na powierzchni ponad 80% LSEC. Obecność CD45 wskazuje, że LSEC nie pochodzą z populacji śródbłonowych komórek progenitorowych CD45<sup>-</sup>, zidentyfikowanej jako populacja prekursorowa dla innych komórek śródbłonka [16][17].

Komórki LSEC są najliczniejszą populacją nieparenchymalnych komórek w wątrobie ssaków [18], które wraz z komórkami KC oraz komórkami dendrytycznymi tworzą układ siateczkowo-śródbłonkowy. Jego funkcją jest pobieranie antygenów i wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP) oraz degradacja produktów i toksyn z krwi zatokowej [19]. LSEC stanowią barierę między hepatocytami a naczyniami zatokowymi wątroby, co ma kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy immunologicznej i metabolicznej [20].

Komórki LSEC są unikalne, z uwagi na fakt że nie posiadają błony podstawnej, co ułatwia przepływ substancji bezpośrednio do przestrzeni Dissego, gdzie dochodzi do ich absorpcji przez mikrokosmki hepatocytów [20] [21]. Kombinacja obecności

fenestracji, braku diafragmy i błony podstawnej sprawia, że są one najbardziej przepuszczalnymi komórkami śródbłonna w organizmach ssaków [22]. LSEC nie tylko tworzą barierę strukturalną w obrębie zatok wątrobowych, ale pełnią także istotne funkcje fizjologiczne i immunologiczne, w tym filtrację, endocytozę, prezentację antygenów oraz rekrutację leukocytów [20]. Dane literaturowe sugerują, że LSEC są populacją komórek niemieloidalnych, zdolną do prezentacji krzyżowej egzogennych antygenów. Kontrastując z prezentacją krzyżową antygenów przez profesjonalne komórki prezentujące, prezentacja przez LSEC prowadzi zazwyczaj do wytworzenia tolerancji immunologicznej [23]. Niemniej jednak, pod wpływem stanu zapalnego lub patogenów, takich jak wirus HBV, LSEC mogą przejść ze stanu tolerogennego do stanu immunogennego, aktywując przy tym cytotoksyczne limfocyty T [24].

Cechą różniącą komórki LSEC od innych komórek śródbłonkowych, jest wysoka zdolność do endocytozy. Sprawnie funkcjonujący proces endocytozy klatrynozależnej cząsteczek zarówno egzogennych, jak i endogennych jest możliwy dzięki ekspresji receptorów zmiatających oraz receptorów endocytozy takich jak: stabilina-1 (Stab1), stabilina-2 (Stab2) oraz receptory dla mannozy [25]–[27] (Ryc. 2). Ligandy poddawane internalizacji są szybko transportowane i degradowane w endolizosomach. LSEC odgrywają także kluczową rolę w odporności nieswoistej poprzez ekspresję receptorów Toll-podobnych (TLR), które rozpoznają i usuwają cząsteczki zawierające wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) i struktury molekularne związane z uszkodzeniem własnych tkanek (DAMP). Na powierzchni LSEC obecne są receptory głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I), które prezentują antygeny limfocytom T CD8<sup>+</sup> i receptory głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II), które prezentują antygeny limfocytom T CD4<sup>+</sup> [27] (Ryc. 2). Ze względu na ograniczoną ilość mitochondriów, komórki LSEC prowadzą metabolizm beztlenowy, a wytworzony mleczan może być wykorzystywany jako źródło energii dla hepatocytów [11][28].



**Rycina 2. Receptory powierzchniowe LSEC.** Na podstawie [27] Opis w tekście.

Chociaż rola w filtrowaniu i oczyszczaniu krwi była wcześniej przypisywana KC [29], najnowsze dane literaturowe sugerują, że działanie komórek LSEC i KC uzupełnia się w tym procesie. LSEC specjalizują się w endocytozie zależnej od klatryny rozpuszczalnych makrocząstek i nanocząstek, podczas gdy większe cząstki, takie jak bakterie oraz martwe i umierające komórki są usuwane przez KC za pomocą fagocytozy. W wychwytywaniu rozpuszczalnych makrocząstek w LSEC pośredniczy szereg receptorów endocytozy, przy czym najlepiej zbadanymi są wspomniane wcześniej receptory dla mannozy, Stab1 i Stab2 [11] [30].

Badania porównawcze sugerują, że komórki LSEC ptaków, gadów i płazów pełnią podobne funkcje jak u ssaków [31], natomiast u ryb LSEC posiadają fenestracje i tworzą filtr [32], lecz nie wykazują znacznej aktywności w procesie endocytozy. Zamiast tego, komórki śródbłonna o funkcjach zmiatających, podobnych do ssaczych komórek LSEC, zlokalizowane są w nerkach, sercu lub skrzelach ryb [31].

### 1.1.2 Komórki Browicza-Kupffera

Komórki KC, początkowo odkryte przez von Kupffera jako „komórki gwiazdiste”, stanowią około 80% całkowitej populacji makrofagów w organizmie oraz około 15% komórek wątroby [33]. KC to makrofagi specyficzne dla wątroby, które przylegają



do komórek śródbłonna wyścielającego zatoki wątrobowe. Komórki te wykazują morfologię ameboidalną, wyposażone są w mikrokosmki i pseudopodia wystające we wszystkich kierunkach, które uczestniczą w endocytozie cząstek [34]. Źródłem populacji KC jest pęcherzyk żółtkowy, gdzie komórki prekursorowe różnicują się w makrofagi płodowe. Gdy dostaną się do krwioobiegu, migrują do wątroby płodowej i tam różnicują się w KC. W typowych warunkach KC są długowieczną populacją zdolną do samoodnowy [35]. Niemniej jednak, gdy populacja rezydentnych KC zostanie wyczerpana, mogą one różnicować się z monocytów pochodzących ze szpiku kostnego. W odróżnieniu od innych makrofagów tkankowych, które muszą być stale odnawiane przez krążące monocyty, KC pochodzące z monocytów są zdolne do samoodnowy [36].

Dzięki swojemu strategicznemu położeniu po stronie światła śródbłonna zatok wątrobowych, komórki KC są idealnie umiejscowione do wykonywania ich głównej funkcji w stanie spoczynkowym, czyli filtrowania krwi wpływającej do wątroby zarówno z żyły wrotnej, jak i tętnicy wątrobowej [29]. KC są pierwszymi komórkami, które nawiązują kontakt z materiałami wchłanianymi z przewodu pokarmowego takimi jak endotoksyny i cząstki stałe, które napływają do wątroby z krwią przez żyłę wrotną, co sprawia, że są uważane za ostatni komponent bariery jelitowej [37]. Komórki KC odgrywają istotną rolę tolerogenną, pozwalając uniknąć indukcji odpowiedzi immunologicznej na nieszkodliwe antygeny, takie jak składniki odżywcze pochodzące z jelit i antygeny ze starych lub martwych komórek, które zostały usunięte z krwioobiegu.

W kontekście nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, KC odgrywają kluczową rolę, a ich lokalizacja w zatokach wątrobowych umożliwia efektywną fagocytozę patogenów pochodzących z krążenia wrotnego lub tętniczego. W efekcie, KC odgrywają rolę przeciwzapalną, zapobiegając przemieszczaniu się substancji pochodzących z jelit przez zatoki wątroby. Co więcej, KC są także odpowiedzialne za usuwanie z krążenia ogólnoustrojowego martwych i obumierających erytrocytów, funkcję, którą również pełnią makrofagi śledzionowe [38].

## 1.2 Hemoglobina

Hemoglobina (Hb) jest białkiem zawierającym żelazo, które wiąże tlen i odgrywa kluczową rolę w jego transporcie z płuc do tkanek, odpowiada także za transport

dwutlenku węgla z tkanek do płuc. Na poziomie strukturalnym, Hb jest tetramerem składającym się z czterech podjednostek (gr.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Każda z tych podjednostek zbudowana jest z łańcucha globinowego oraz zawiera grupę prostetyczną - hem. W przypadku osób dorosłych, ponad 95% hemoglobiny występuje w formie HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ). Dodatkowo, HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) stanowi około 2,2–3,5%, natomiast płodowa HbF stanowi mniej niż 1% hemoglobiny zdrowej osoby dorosłej. U noworodków HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) stanowi 50–95% całkowitej hemoglobiny, jednak jej poziom zaczyna spadać po około sześciu miesiącach, kiedy to zaczyna się produkcja HbA. Znacząco większe powinowactwo HbF do tlenu w porównaniu do HbA ułatwia transfer tlenu w łożysku między krążeniem matki i płodu [39].

Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  składają się odpowiednio z 7 i 8 helis, które są określane jako A–H. W każdej podjednostce hem umieszczony jest pomiędzy helisami E i F [40]. Synteza hemu zachodzi w cytozolu i mitochondriach erytrocytów, natomiast łańcuchy globin są syntetyzowane w cytozolu erytrocytów. Hem składa się z pierścienia protoporfiryny i centralnie zlokalizowanego jonu żelaza w formie zredukowanej ( $\text{Fe}^{2+}$ ) [41]. Częsteczką tlenu może być przyłączona tylko przez hemoglobinę zawierającą zredukowaną formę żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jon żelaza tworzy sześć wiązań w obrębie grupy hemowej. Cztery z nich wiążą atomy azotu, jedno jest skierowane do tzw. histydyny proksymalnej (F8), a ostatnie wiąże tlen [42].

Hemoglobina charakteryzuje się obecnością dwóch stanów konformacyjnych: stanu T (ang. *tense*-napięta) oraz stanu R (ang. *relaxed*-rozluźniona). Kluczową różnicą między tymi dwoma stanami jest ich powinowactwo do wiązania cząsteczek tlenu. W stanie niezwiązanym z tlenem, deoksyhemoglobina występuje w stanie T, gdzie powinowactwo do tlenu jest stosunkowo niskie. Wiązanie pierwszej cząsteczki tlenu indukuje zmianę konformacyjną, która prowadzi do destabilizacji stanu T, co z kolei ułatwia przejście pozostałych podjednostek do stanu R, cechującego się wysokim powinowactwem do tlenu. Powoduje to, że po związaniu pierwszej cząsteczki tlenu, kolejne (druga, trzecia, czwarta) mogą łączyć się z hemoglobiną z coraz większym powinowactwem. Ta unikalna zdolność hemoglobiny do zmiany konformacji w celu przyłączenia tlenu nazywana jest kooperatywnością i pozwala na efektywne wiązanie  $\text{O}_2$  [43].

### 1.2.1 Hemoliza i metabolizm wolnej Hb

Erytrocyty (ang. *red blood cells*; RBC), są komórkami krwi zawierającymi hemoglobinę i są wytwarzane w szpiku kostnym kości długich, takich jak kość udowa i kość ramienna, oraz kościach płaskich, takich jak mostek i żebra [41]. Erytropoeza, czyli proces tworzenia erytrocytów, jest kontrolowany przez poziom erytropoetyny, hormonu uwalnianego przez nerki w reakcji na niedotlenienie komórkowe. Hb może być uwalniany z RBC do osocza i środowiska pozakomórkowego podczas hemolizy lub uszkodzenia tkanki (Ryc. 3). Hemoliza to rozpad krwinki czerwonej, skutkujący uwolnieniem hemoglobiny do osocza. Można ją również określić jako nekrozę erytrocytów, co jest zjawiskiem naturalnym pod koniec cyklu życia każdego erytrocytu [44].

Dane literaturowe wskazują, że w spoczynkowym stanie fizjologicznym człowieka, około 10% RBC może ulegać lizie w naczyniach krwionośnych, uwalniając w ten sposób Hb [45] [46]. Niektóre stany chorobowe, w tym anemie dziedziczne takie jak niedokrwistość sierpowatokrwińkowa lub talasemia, autoimmunologiczne choroby hemolityczne lub infekcje, charakteryzują się osłabioną stabilnością erytrocytów i zwiększonym ryzykiem hemolizy [46][47]. Hemoliza jest także obserwowana po przetoczeniach krwi. Dane literaturowe sugerują, że wydłużenie okresu przechowywania między pobraniem krwi a transfuzją, prowadzi do zwiększonej hemolizy poprzetoczeniowej [48][49].

Wyróżniamy dwie formy hemolizy: wewnątrznaczyniową, podczas której erytrocyty są niszczone w obrębie krążenia krwi, prowadząc do uwolnienia pozakomórkowej Hb do krwiobiegu, oraz hemolizę pozanaczyniową, w której RBC są fagocytowane w układzie monocytarno-makrofagowym w wątrobie i śledzionie. Hemoliza skutkuje uwolnieniem i zwiększonym stężeniem pozakomórkowej formy hemu w osoczu krwi, a tym samym zaburza działanie fizjologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za usuwanie wolnego hemu [50].

Wczesne patofizjologiczne reakcje na obecność zewnątrzkomórkowej Hb w osoczu obejmują wzrost ciśnienia krwi oraz prooksydacyjną toksyczność, objawiającą się w naczyniach krwionośnych i nerkach. Hb łatwo rozpada się na heterodimery, które są wystarczająco małe, aby przedostać się do tkanek takich jak nerka czy ściany naczyń [51]. Negatywne skutki kliniczne związane z hemolizą wewnątrznaczyniową

wynikają z zdolności wolnej Hb do wiązania tlenu azotu (NO), który reguluje napięcie mięśni gładkich naczyń, hamuje agregację płytek krwi oraz adhezję leukocytów do śródbłonka [52]. Proces ten prowadzi do zwężenia naczyń, zaburzenia przepływu krwi, nasilenia stanu zapalnego, agregacji płytek krwi i w efekcie do uszkodzenia narządów [53]. W większości wolna Hb pozostaje we krwi w formie zredukowanej ( $Fe^{2+}$ ), zdolnej do wiązania NO. Jednak w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego, Hb może ulec autooksydacji do methemoglobiny ( $Fe^{3+}$ ) lub feryllohemoglobiny ( $Fe^{4+}$ ). Utlenienie methemoglobiny powoduje destabilizację połączenia pomiędzy hemem a globiną, hem inkorporuje się w błony komórkowe i lipoproteiny, gdzie wywołuje peroksydację lipidów prowadząc do uszkodzenia tkanek [54]. Wolna Hb jest głównie eliminowana z krwi przez nerki, co sprawia, że są one najbardziej narażonym narządem podczas hemolizy wewnątrznaczyniowej. Po filtracji, postępujące zakwaszenie moczu przyspiesza utlenianie Hb, destabilizację strukturalną globiny i uwalnianie hemu [55]. Efekty widoczne w nerkach obejmują m.in. odkładanie się globiny w postaci wałeczków białkowych w osadzie moczu oraz uszkodzenia kanalików nerkowych [46].

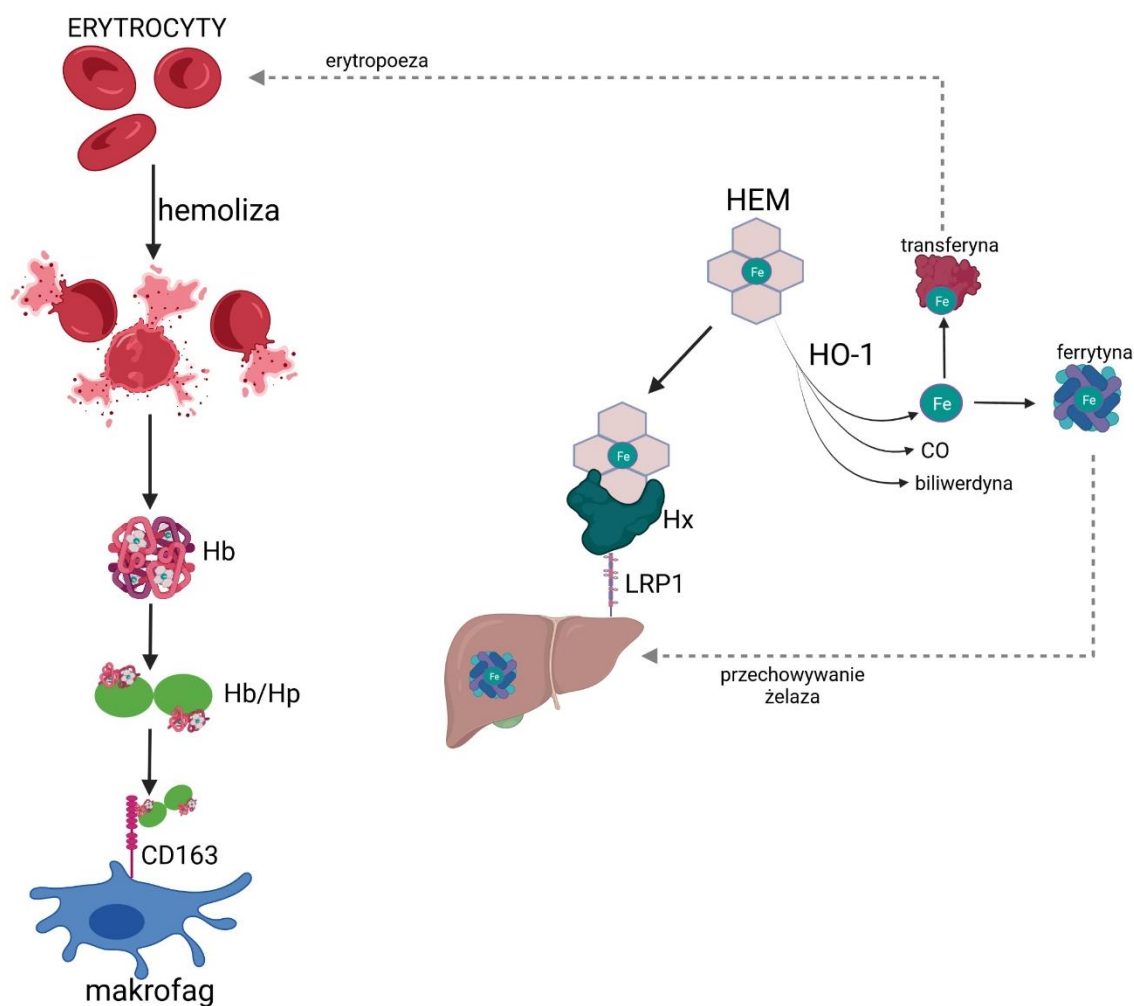
Systemy detoksykacyjne, które ograniczają szkodliwość uwolnionej zawartości erytrocytów opierają się na działaniu rozpuszczalnych białek osocza, wśród których najważniejsze to haptoglobina (Hp) i hemopeksyna (Hx). Zarówno Hp, jak i Hx są białkami ostrej fazy, których synteza jest indukowana podczas infekcji lub stanów zapalnych aby zminimalizować uszkodzenia tkankowe i wspomóc proces ich regeneracji [46]. W momencie uwolnienia Hb z erytrocytów, pierwszą linią obrony jest Hp, która nieodwracalnie wiąże się z wolną Hb [56]. Powstały kompleks jest szybko usuwany z krążenia poprzez endocytozę z udziałem receptora CD163, obecnego na powierzchni komórek KC, następnie jest degradowany w wątrobie. Proces ten skutkuje obniżeniem stężenia Hp w osoczu. CD163 jest białkiem błonowym występującym na powierzchni makrofagów, w tym makrofagów śledzionowych i wątrobowych. Wewnątrz makrofagów, hem jest uwalniany z globiny i rozkładany przez oksygenazę hemową-1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1) do żelaza, tlenu węgla i biliwerdyny, która następnie ulega redukcji do bilirubiny. Żelazo jest eksportowane z komórki przez ferroportynę lub przechowywane w kompleksie z ferrytyną (Ryc. 3).

W przypadku hiperhemolizy lub przewlekłej hemolizy, obecność pozakomórkowej hemoglobiny w osoczu może przeciążyć ten system detoksykacyjny,

powodując zwiększone zużycie endogennego NO i tworzenie się methemoglobiny (hemoglobiny zawierającej utlenioną formę żelaza-  $Fe^{3+}$ ), z której uwalniany jest wolny hem. Wolny hem wpływa na zwiększone zużycie NO i zwężenie naczyń krwionośnych poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych i aktywację śródbłonna, pełniąc jednocześnie rolę prozapalnego ligandu receptorów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (np. TLR4). Proces ten sprzyja również rekrutacji komórek zapalnych, agregacji płytek krwi i utlenianiu lipoprotein [57].

Hemopeksyna (Hx) pełni kluczową rolę w ograniczaniu toksyczności hemu, przez formowanie z nim stabilnego kompleksu białkowego. Dzięki temu mechanizmowi, Hx zapobiega interkalacji hemu do błon komórkowych oraz lipoprotein osocza, gdzie mogłaby uczestniczyć w reakcjach z nadtlenkami organicznymi, czego efektem jest generowanie reaktywnych form tlenu w przestrzeniach tkankowych. Kompleks hem-Hx jest usuwany głównie przez hepatocyty w procesie endocytozy za pośrednictwem receptora LDL (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*; LRP 1) (Ryc. 3). Należy zauważyć, że LRP1 ulega ekspresji nie tylko przez hepatocyty, ale również przez inne typy komórek, takie jak makrofagi, neurony i syncytiotrofoblasty. Rola tych typów komórek, jak również ewentualne udział alternatywnych receptorów w eliminacji kompleksu hem-Hx, pozostaje do dalszych badań [58]. Hx dodatkowo działa poprzez hamowanie aktywacji receptorów odpornościowych i procesów zapalnych w naczyniach. Wiązanie hemu przez Hx łagodzi negatywne efekty hemu na śródbłonek naczyniowy, zabezpieczając tym samym przed procesami oksydacyjnymi w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W ten sposób zapobiega stanom zapalnym oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Połączenie właściwości Hp i Hx pozwalają kompleksom Hb-Hp i hem-Hx krążyć we krwi w mniej toksycznej formie, aż do momentu ich eliminacji przez odpowiednie receptory zmiatające [59].

Podstawowym celem hemolizy pozanaczyniowej jest eliminacja krążących erytrocytów, które uległy procesowi starzenia. W trakcie tego typu hemolizy, zawartość krwinek czerwonych, głównie Hb, nie jest uwalniana bezpośrednio do osocza, ponieważ krwinki ulegają lizie wewnątrz makrofagów. Jednak niedawna publikacja sugeruje, że niektóre stare erytrocyty unikają erytrofagocytozy i ulegają lizie lokalnie w śledzionie, uwalniając w ten sposób hemoglobinę (Hb) do krążenia [45].



**Rycina 3. Systemy detoksykacyjne wolnej Hb.** Hb jest uwalniana z erytrocytów do osocza podczas hemolizy lub uszkodzenia tkanki. Wolna Hb jest wiązana przez haptoglobinę (Hp), kompleks Hb-Hp podlega endocytozie przez receptor CD163 na makrofagach. W makrofagu hem jest uwalniany z globiny i rozkładany przez HO-1 do biliwerdyny, CO i żelaza. Żelazo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) magazynowane jest w kompleksach ferrytynowych lub eksportowane poza komórkę i transportowane przez transferynę do wykorzystania w erytropoezie. Hem może być wiązany przez hemopeksynę (Hx), kompleks hem-Hx endocyutowany jest przez receptor LRP1 obecny na makrofagach i hepatocytach.

Produkty degradacji Hb pochodzące z tego procesu są odzyskiwane i poddawane recyklingowi. W szczególności żelazo pochodzące z hemoglobiny jest przechowywane wewnątrzkomórkowo w kompleksach ferrytyny, lub uwalniane z powrotem do osocza, gdzie wiązane jest przez transferynę i dalej może zostać wykorzystywane do erytropoezy (Ryc. 3). W krążeniu, żelazo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) jest przenoszone przez transferynę, która wiąże je z wysokim powinowactwem i zapobiega tworzeniu reaktywnych form tlenu [60].

W stanie homeostazy, tempo eliminacji erytrocytów jest zrównoważone z tempem ich produkcji, co prowadzi do utrzymania równowagi pomiędzy generowaniem produktów degradacji a ponownym ich wykorzystaniem. Ten proces ulega jednak intensyfikacji po przetoczeniu krwi, gdzie statystycznie do 25% przetoczonych RBC może zostać usuniętych z krążenia [48].

Klinicznie działania niepożądane transfuzji wynikają z połączenia hemolizy wewnątrz- i poza-naczyniowej, a także są efektem złożonych zmian biochemicznych i strukturalnych zachodzących podczas przechowywania krwi pomiędzy jej pobraniem a przetoczeniem (ang. *storage lesion*) [50] [61]. Uszkodzone lub starzejące się erytrocyty mogą z czasem gromadzić się jako populacja niskiej jakości w przechowywanych workach z krwią. Podczas przetaczania dłużej przechowywanej krwi możliwe jest wystąpienie ostrej hemolizy. Większość RBC uszkodzonych podczas przechowywania jest bardzo szybko usuwana z krążenia (w ciągu pierwszej godziny po transfuzji), co powoduje nadmierną szybkość dostarczania żelaza hemowego do makrofagów siateczkowo-śródbłonkowych. 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 [48] [49] [60].

Makrofagi miazgi czerwonej śledziony (ang. *red pulp macrophages*, RPM) pośredniczą w obrocie miliardów starzejących się erytrocytów dziennie, jednakże molekularne mechanizmy zaangażowane w ich rozpoznawanie i późniejszą degradację przez RPM nie są w pełni poznane [62] [63]. Badania wykazały, że specyficzne cząsteczki adhezyjne erytrocytów, które są aktywowane na starzejących się erytrocytach, powodują ich interakcję z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej w śledzionie. Ta interakcja prowadzi do kurczenia się erytrocytów i ostatecznie do hemolizy. Zaobserwowano, że śledziona jest nasycona pozostałościami błon erytrocytów, które utraciły zawartość hemoglobiny i są wychwytywane, a następnie degradowane przez RPM. Proces ten stanowi, obok erytrofagocytozy, dodatkowy sposób usuwania starzejących się erytrocytów, który może wyjaśniać pozorną rozbieżność w poziomie obserwowanej i przewidywanej erytrofagocytozy w RPM. Jak wspomniano powyżej ostatnie badania sugerują, że część starzejących się erytrocytów nie podlega erytrofagocytozie, ale lokalnie ulega lizie w śledzionie, uwalniając Hb [45].

### 1.3 Makropinocytoza

Makropinocytoza jest formą endocytozy, charakteryzującą się niespecyficznym wewnątrzkomórkowym wchłanianiem dużych ilości płynu pozakomórkowego. Odróżnia ją to od fagocytozy, która jest inicjowana bezpośrednio przez interakcje między receptorami powierzchniowymi komórki a ich odpowiednimi ligandami. Proces makropinocytozy jest indukowany przez marszczenie się błony komórkowej, które jest indukowane przez dynamiczną przebudowę cytoszkieletu aktynowego [64]. Marszczone błony formują struktury o kształcie miseczek, które zamykają się na swoich dystalnych końcach, tworząc stosunkowo duże (0,2-5  $\mu\text{m}$ ) endosomy, określane makropinosomami. Makropinosomy mogą powstawać spontanicznie lub być indukowane przez czynniki wzrostu, chemokiny lub pobudzenie receptorów Toll-podobnych [65]. W procesie tym kluczową rolę odgrywa cytoszkielet aktynowy i związane z nim białka. Przykładem są białka z rodziny Rho, w tym GTPaza Cdc42, odgrywająca kluczową rolę w regulacji cytoszkieletu aktynowego, aktywując kinazę Pak1 zlokalizowaną w miejscach marszczenia się błony. Proces ten umożliwia formowanie się makropinosomów w wyniku przemodelowania aktyny [66] [67]. Makropinocytoza różni się znacząco od lepiej opisanej mikropinocytozy, która obejmuje endocytozę pęcherzyków pokrytych klatryną oraz małych nieopłaszczonych pęcherzyków. Ze względu na stosunkowo duże rozmiary makropinosomów, stanowią one efektywny mechanizm do nieselektywnej endocytozy rozpuszczonych makrocząsteczek [68]. Proces makropinocytozy jest intensywnie badany w kontekście komórek prezentujących antygen, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne, choć wiele innych typów komórek, w tym komórki śródbłonna, wykazuje zdolność do tego procesu [69].

Pomimo znaczenia procesu makropinocytozy dla fizjologii, mechanizmy molekularne leżące u jej podstaw pozostają tylko częściowo poznane. Jest to głównie wynik trudności w badaniu tego procesu. W przeciwieństwie do pęcherzyków zaangażowanych w endocytozę klatrynozależną, makropinosomy nie wykazują widocznej specyficznej struktury płaszczą, a żadne unikalne cząsteczki obecne na błonach makropinosomów nie zostały dotąd zidentyfikowane [70]. Zamiast tego makropinosomy są zazwyczaj znakowane znacznikami fazy płynnej, które są internalizowane głównie,

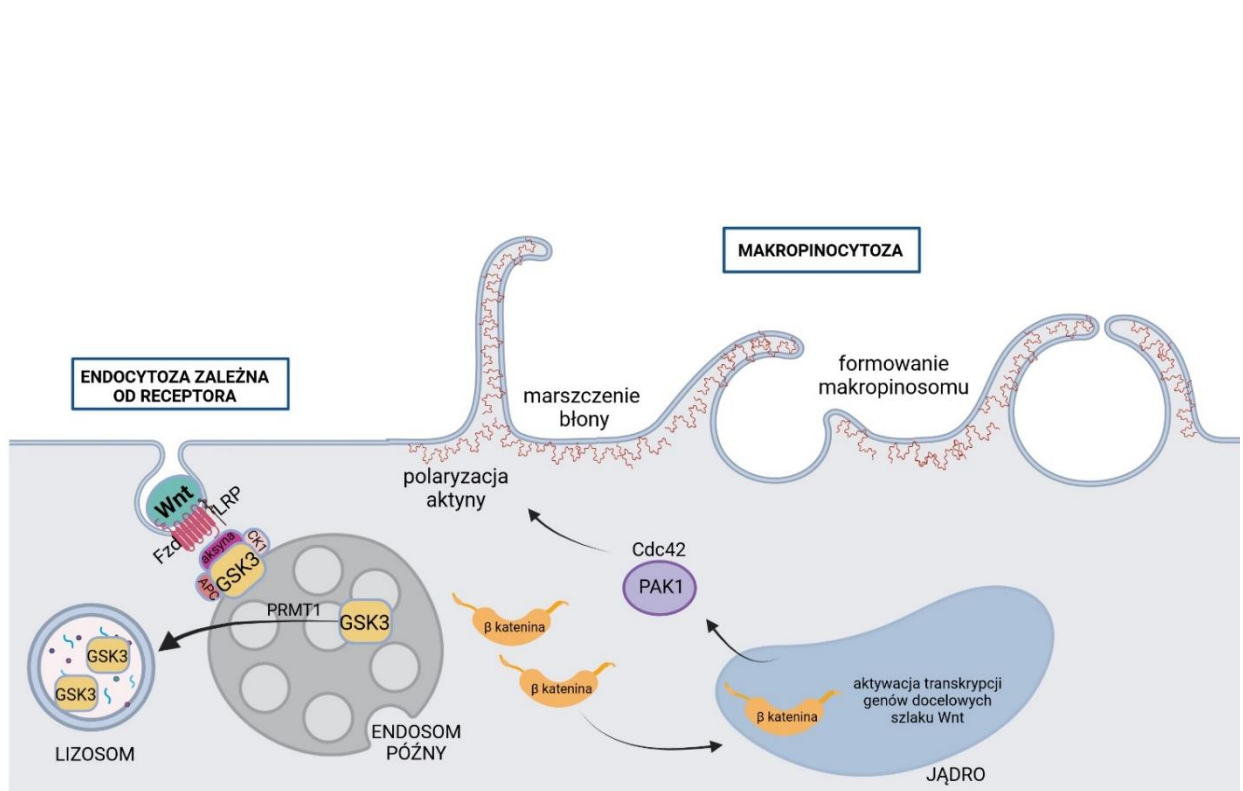


przez makropinocytozę, takimi jak dekstran i albumina [69]. Dodatkową trudnością w badaniu makropinocytozy jest brak związków specyficznie hamujących ten proces. Powszechnie stosowane w tym celu związki hamują polimeryzację aktyny, która jest niezbędna dla formowania się makropinosomów, ale jednocześnie hamują inne typy endocytozy oraz wiele innych procesów komórkowych [71].

### 1.3.1 Wpływ kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt na makropinocytozę.

Dane literaturowe wskazują, że makropinocytoza może być indukowana przez zależną od  $\beta$ -kateniny (kanoniczną) ścieżkę sygnałową Wnt, poprzez aktywację kinazy Pak1 [72] (Ryc. 4), lub poprzez szybką stymulację transportu błonowego niezależną od syntezy nowych białek [73]. Ścieżka sygnałowa Wnt odpowiada za regulację proliferacji i różnicowania się komórek, a także procesy embriogenezy. Stwierdzono, że w obecności Wnt, duże ilości pakietów zawierających białka i glikoproteiny, są kierowane do lizosomów poprzez fuzję z mniejszymi pęcherzykami zawierającymi kinazę syntazy glikogenu  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) i białkową etylotransferazę argininową 1 (PRMT1), enzym niezbędny dla kanonicznej ścieżki Wnt [73][74]. W kanonicznej ścieżce sygnałowej Wnt, związanie liganda Wnt do kompleksu receptorów Frizzled-LRP5/6 (Fzd-LRP5/6), powoduje zablokowanie aktywności białkowego kompleksu naznaczającego  $\beta$ -kateninę do degradacji. Kompleks ten składa się z aksyny, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), CK1 (kinazy kazeinowej 1) i GSK3 $\beta$  [75]. Czynnikiem istotnym dla inaktywacji tego kompleksu jest PRMT1, który odpowiada za metylację argininy i sekwestrację GSK3 $\beta$ . Dzięki zablokowaniu działania kompleksu białkowego (aksyna/APC/CK1/GSK3 $\beta$ )  $\beta$ -katenina nie jest degradowana i translokuje do jądra komórkowego, gdzie wiążąc się z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TCF/LEF, umożliwia ekspresję genów docelowych ścieżki sygnałowej Wnt [74]. W trakcie aktywacji ścieżki Wnt, makropinocytoza receptora Fzd-LRP5/6 powoduje sekwestrację GSK3 $\beta$  wewnątrz pęcherzyków. Gdy poziom GSK3 $\beta$  w cytozolu spada, kinaza Pak1 indukuje przebudowę aktyny co umożliwia formowanie się miseczek makropinocytarnych, które zamykają i pochłaniają makrocząsteczki z otaczającego środowiska. Geny docelowe szlaku Wnt, które są odpowiedzialne za aktywację Pak1 nie są jeszcze poznane, potencjalni kandydaci, którzy zostali zidentyfikowani to m.in. sam PAK1, RAB5 i PDK1 [72][76].

Co ciekawe, obecność ligandów i receptorów szlaku Wnt scharakteryzowano w LSEC, co ma wpływ na formowanie się subpopulacji hepatocytów i procesy regeneracji wątroby [77][78]. Ponadto, zidentyfikowano, że cząsteczka Wnt2 obecna w LSEC, działa jako komórkowo specyficzny czynnik wzrostu, stymulujący krzyżowo szlak VEGF, który jest kluczowy dla różnicowania się LSEC [79].



**Rycina 4. Regulacja makropinocytozy przez kanoniczną ścieżkę sygnałową Wnt.** Ligand Wnt wiąże się do receptorów Fzd/LRP5/6. Kompleks ten internalizowany jest za pomocą zależnej od receptora endocytozy. GSK3 $\beta$  oddysocjowuje od kompleksu naznaczającego  $\beta$ -kateninę do degradacji (APC, CK1, aksyna, GSK3 $\beta$ ) i jest sekwestrowana w małych pęcherzykach w endosomie późnym i transportowana do lizosomu. Gdy poziom GSK3 $\beta$  w cytozolu spada,  $\beta$ -katenina translokuje do jądra komórkowego, gdzie uruchamia się transkrypcja genów docelowych ścieżki Wnt. PAK1 aktywuje podbłonowe mechanizmy przebudowy aktyny umożliwiające formowanie makropinosomów, które zamykają i pochłaniają makrocząsteczki. Na podstawie [73] i [76].

## 2. Założenia i cele pracy

Hb uwalniana z erytrocytów podczas hemolizy wiązana jest w osoczu przez haptoglobinę, następnie kompleks ten usuwany jest przez tkankowe makrofagi obecne w wątrobie i śledzionie. Jednak inne drogi usuwania Hb mogą również brać udział w tym procesie, zwłaszcza kiedy ta kanoniczna zostanie wysycona. W przypadku, kiedy zbyt duża ilość wolnej Hb wymyka się spod nadzoru mechanizmów antyoksydacyjnych, okoliczne tkanki są narażone na zmiany związane ze stresem oksydacyjnym. Dane literaturowe sugerują, że wychwytywanie wolnej hemoglobiny z krwi może przebiegać inaczej niż dotąd sądzono. Wsparciem dla tej hipotezy była nasza nieoczekiwana obserwacja, która dała początek temu projektowi, kiedy to po usunięciu makrofagów z wątroby, nadal większość Hb była wychwytywana przez ten organ.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie i scharakteryzowanie alternatywnego mechanizmu wychwytu wolnej Hb w modelu mysim poprzez:

- zbadanie biodystrybucji Hb w narządach po deplecji makrofagów,
- scharakteryzowanie głównej populacji komórek wątroby odpowiedzialnej za pobieranie Hb,
- określenie roli głównych populacji komórek wątrobowych w wychwycie Hb,
- zbadanie mechanizmu, za pomocą którego zidentyfikowana populacja komórek pobiera Hb.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Zwierzęta doświadczalne

Samice myszy Balb/c typu dzikiego zostały zakupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Myszy utrzymywano w warunkach standardowych (temperatura 22°C (± 2°C), wilgotność 55 % (± 5%), cykl świetlny wynosi 13 godzin światła/11 godzin ciemności) w Zwierzętarni Zakładu Immunologii w Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii w Warszawie lub w Zwierzętarni Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Wszystkie eksperymenty *in vivo* przeprowadzono na podstawie zgód wydanych przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (WAW2/138/2019 WAW2/152/2020, WAW2/179/2021, WAW2/053/2022). Zgody wydano na podstawie ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dnia 15 stycznia 2015 r. (Dz. Ust. z 2019r.poz. 266).

#### 3.2 Izolacja Hb

Hb izolowano świeżej krwi od myszy. Krew obwodową pobierano z serca, bezpośrednio po eutanazji do probówek z litową solą heparyny (Microvette 500, SARSTEDT). Następnie krew wirowano (500 rcf, 5 minut), odrzucano frakcję osocza i kożuszek leukocytarny. Osad ponownie zawieszano w PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut), płukanie powtarzane było 4 razy. Następnie erytrocyty wirowano (3000 rcf, 5 minut), osad zawieszano w 20 ml zimnej wody i inkubowano przez noc w 4°C. Na koniec roztwór wirowano (3000 rcf, 5 minut) i zatężano przy użyciu jednostki filtrującej Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) z porami 10 kDa do uzyskania objętości 1 ml. Stężenie Hb mierzono techniką UV-VIS za pomocą NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) i obliczono na podstawie prawa Beera– Lamberta i współczynnika ekstynkcji hemu (167000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) przy 415 nm.

### 3.3 Koniugacja białek z fluorochromem

Ester NHS barwnika Alexa Fluor™ 750 (AF750) lub 647 (AF647) (Thermo Fisher) rozpuszczano w DMSO i rozcieńczano w 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3. Białka- Hb lub BSA (Sigma) rozpuszczano w 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3. Roztwory białka i barwnika mieszano w stosunku molowym białka do barwnika 1:2,5 i inkubowano w 25°C w ciemności przez 2 godziny z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie koniugat płukano buforem zawierającym 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3 i zatężano przy użyciu jednostki filtrującej Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) z porami 10 kDa (4000 rcf, 15 minut) do objętości 1 ml. Stężenie białek mierzono techniką UV-VIS za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Stężenie Hb obliczono na podstawie prawa Beera-Lamberta i współczynnika ekstynkcji hemu (167000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) przy 415 nm. Stężenie BSA mierzono przy użyciu modułu dla białek. Skuteczność koniugacji potwierdzono za pomocą analizy spektrometrii mas. Próbkę rozpuszczano w buforze 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% Tween 20, pH 8.0 i analizowano za pomocą urządzenia Q-ToF Premier ESI-MS (Waters) w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

### 3.4 Kompleksowanie Hb i Hp

Kompleksowanie Hb i Hp wykonano na podstawie [80]. Roztwory Hb-AF750 i haptoglobiny (Hp) mieszano w stosunku molowym 1:4 (Hb-AF750:Hp) i inkubowano przez 30 minut w 4 °C w ciemności. Następnie kompleks wirowano przy użyciu jednostki filtrującej Amicon® Ultra-0.5 (Merck Millipore) z porami 100 kDa (4000 rcf, 3 minuty). Procedura ta pozwoliła na ocenę wydajności kompleksowania. Pomiary wykonane przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) nie wykazały zawartości białka w filtracie, co świadczy o skuteczności reakcji. Jeden tetramer Hp (85kDa) wiąże dwa dimery Hb (64kDa), tak więc gdyby kompleksowanie nie powiodło się, białko byłoby obecne w przesączu.

## 3.5 Iniekcje

### 3.5.1 Iniekcje dożylnie

Myszy umieszczano w klatce grzewczej na 5 minut. Następnie myszy kolejno przekładano do unieruchamiacza (WITKO) w celu wykonania iniekcji dożylniej. Białka i koniugaty białkowe podawano poprzez iniekcję do żyły ogonowej. W celu farmakologicznej deplecji makrofagów myszom wstrzykiwano dożylnie liposomy zawierające kwas kłodronowy (5ml/kg) (LIPOSOMA) na 24 godziny, myszom kontrolnym podawano kontrolne liposomy bez kwasu kłodronowego. Wszystkie iniekcje, o objętości 100-200  $\mu$ l, wykonywano za pomocą strzykawki tuberkulinowej z wtopioną igłą o grubości 27G (BD Biosciences).

### 3.5.2 Iniekcje dootrzewnowe

W doświadczeniu z wykorzystaniem hemolizy indukowanej farmakologicznie, myszom podawano dootrzewnowo fenylohydrazynę (ang. *phenylhydrazine*; PHZ) (Sigma) w PBS (125  $\mu$ g/g masy ciała) na 6 godzin, myszy kontrolne otrzymywały dootrzewnowo PBS. Iniekcje o objętości 100  $\mu$ l, wykonywano za pomocą strzykawki tuberkulinowej z wtopioną igłą o grubości 27G (BD Biosciences). Parametry krwi obwodowej po podaniu PHZ (hematokryt oraz ilość erytrocytów we krwi) oznaczano wykorzystując analizator hematologiczny Hemavet 950 (Drew Scientific).

## 3.6 Izolacja komórek z narządów

### 3.6.1 Izolacja komórek nieparenchymalnych i hepatocytów z wątroby

Myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej). W celu izolacji komórek nieparenchymalnych, płaty wątroby pobierano i perfundowano PBS za pomocą pompy perystaltycznej. Następnie płaty wątroby rozdrabniano za pomocą nożyczek i trawiono enzymatycznie w pożywce RPMI zawierającej kolagenazę typu IV (600 U, Merck) oraz DNAzę (400 U, Merck) przez 40 minut w 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Kawałki narządu

przepuszczano przez sitko do separacji komórek (o średnicy porów 100  $\mu\text{m}$ ) i płukano PBS. Zawiesinę dwukrotnie wirowano w celu oddzielenia osadu hepatocytów (50 rcf, 3 minuty). Roztwór z nad osadu hepatocytów zawierający komórki nieparenchymalne wirowano (750 rcf, 15 minut). Frakcję komórek zawieszano w 500  $\mu\text{l}$  PBS. W celu oczyszczenia komórek nieparenchymalnych, po uśmierceniu myszy wątrobę perfundowano PBS lub kolagenazą (Liver Digest Medium, ThermoFisher) przez żyłę główną za pomocą pompy perystaltycznej. Następnie wątroby wycinano, rozdrabniano za pomocą nożyczek i przepuszczano przez sitko do separacji komórek o średnicy porów 100  $\mu\text{m}$ . Zawiesinę dwukrotnie wirowano w celu oddzielenia osadu hepatocytów (50 rcf, 3 minuty), komórki nieparenchymalne pozostały w roztworze.

### 3.6.2 Izolacja komórek śledziony

Myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej). Śledzionę rozdrabniano za pomocą nożyczek i trawiono enzymatycznie w pożywce RPMI zawierającej kolagenazę typu IV (600 U, Merck) oraz DNAzę (400 U, Merck) przez 20 minut w 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie kawałki narządu przepuszczano przez sitko do separacji komórek o średnicy porów 100  $\mu\text{m}$ , wypłukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut). Komórki zawieszano w buforze do lizy erytrocytów (ACK Lysing Buffer, Gibco), inkubowano przez 7 min. w temperaturze pokojowej, po czym płukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut). Frakcję komórek zawieszano w 1 ml PBS.

### 3.6.3 Izolacja komórek szpiku kostnego

Myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej). Komórki izolowano z kości udowych i piszczelowych. Z wypreparowanych kości odcinano nasady i umieszczano je pionowo, w specjalnie przyciętej końcówce do pipety automatycznej umieszczonej w probówce typu Eppendorf tak, aby kość nie dotykała dna. Następnie próbówki wirowano (1000 rcf, 1 minuta), po czym uzyskany osad zawierający komórki szpikowe zawieszano w buforze do lizy erytrocytów (ACK Lysing Buffer, Gibco), inkubowano 5 min. w temperaturze

pokojujowej i filtrowano przez sitko do separacji komórek o średnicy porów 100  $\mu\text{m}$ . Komórki płukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut), uzyskaną frakcję komórek zawieszano w pożywce RPMI zawierającej kolagenazę typu IV (600 U, Merck) oraz DNAzę (400 U, Merck) i inkubowano przez 15 minut w 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie komórki płukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut).

#### 3.6.4 Izolacja komórek aorty

Myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanka Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej). Wypreparowaną aortę rozdrabniano za pomocą nożyczek i trawiono enzymatycznie (mieszanka: kolagenaza typu I 450 U/ml, kolagenaza typu XI 125 U/ml, hialuronidaza typu I-s 60 U/ml, DNaza I 60 U/ml), przez 60 minut w 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie kawałki narządu filtrowano przez 100  $\mu\text{m}$  sitko do separacji komórek, płukano PBS i wirowano (500 rcf, 5 minut).

#### 3.7. Cytometria przepływowa

Analizę populacji komórek z wyizolowanych organów myszy przeprowadzono przy użyciu cytometrów przepływowych BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) lub BD Canto II (BD Biosciences). Sortowanie komórek przeprowadzono przy użyciu cytometru z funkcją sortera BD FACSAria III (BD Biosciences). Wyizolowane komórki zawieszano w roztworze barwnika do oceny żywotności Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (1:400) i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności, po czym płukano PBS (500 rcf, 5 minut). Następnie komórki zawieszano w 5% roztworze surowicy szczurzej w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał do receptorów Fc. Po 15 minutowej inkubacji w 4°C dodawano mieszaninę przeciwciał znakowanych fluorochromami i inkubowano przez 40 minut w 4°C w ciemności. Następnie komórki płukano w PBS (500 rcf, 5 minut) i zawieszano w buforze BD FACSTFlow™. Bezpośrednio przed analizą, zawiesinę komórek przekładano do probówek z sitkiem o średnicy porów 35 $\mu\text{m}$ . Dokładne strategie bramkowania przedstawia rycina 5.



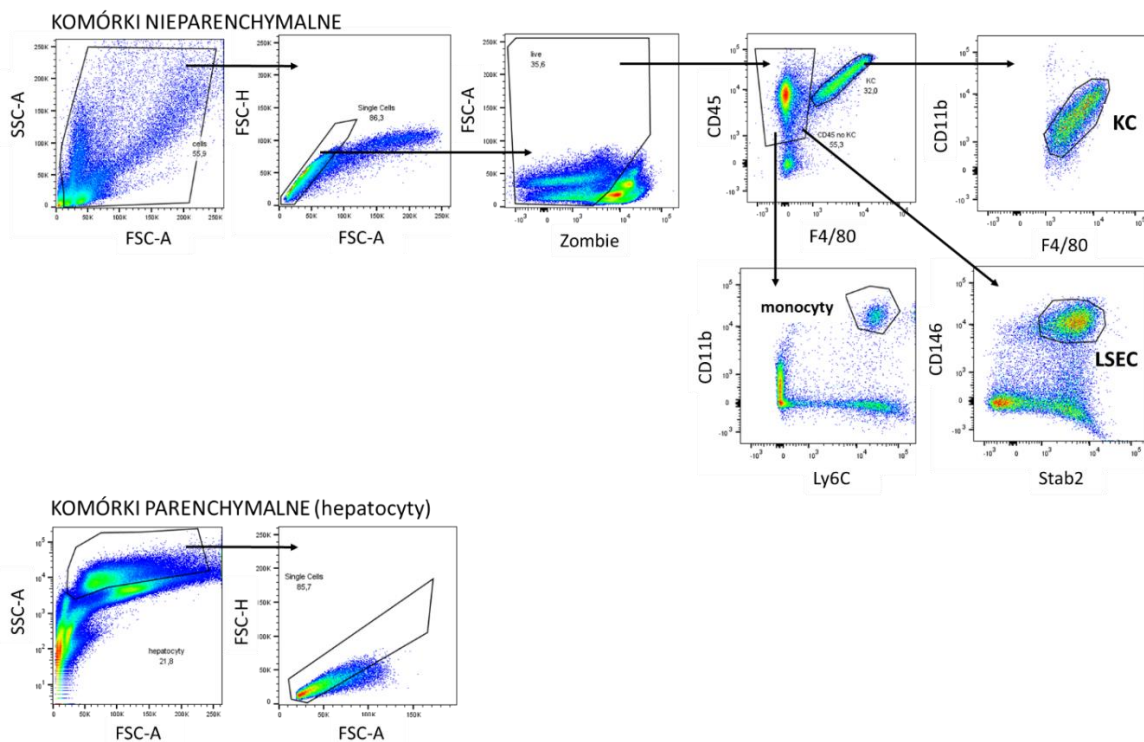
Komórki wątroby barwiono następującymi przeciwciałami znakowanymi fluorochromem: anty-CD45 Pe-Cy7 (Biolegend) anty-F4/80 APC-Cy7 (Biolegend), anty-CD11b PerCP (Biolegend), anty-CD146 PE (Biolegend), anty-CD31 FITC (Biolegend), anty-Ly6C APC (eBioscience) oraz nieznakowanym pierwszorzędowym przeciwciałem króliczym anty-Stab2 (St John's Laboratory). Po płukaniu przeprowadzono barwienie drugorzędowym przeciwciałem oślim anty-króliczym IgG znakowanym AF-647 (Invitrogen) w rozcieńczeniu 1:200 przez 30 minut, w 4°C. Po wyodrębnieniu pojedynczych i żywych komórek, komórki LSEC bramkowano jako populację o umiarkowanej ekspresji CD45, wysokiej ekspresji Stab2 i CD146, całkowicie pozbawioną ekspresji F4/80. KC bramkowano jako populację z wysoką ekspresją CD45 i F4/80 i umiarkowaną ekspresją CD11b. Monocyty bramkowano jako populację o wysokiej ekspresji CD45, CD11b i Ly6C. Wyszortowano dwie populacje komórek wątroby: KC (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) i LSEC (CD45<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>).

Komórki śledziony barwiono następującymi przeciwciałami znakowanymi fluorochromem: anty-CD45 PerCP (Biolegend), anty-F4/80 PE (Biolegend), anty-CD11b BrilliantViolet 605 (Biolegend), anty-CD45R/B220 Pacific Blue (Biolegend), anty-CD3 Pacific Blue (Biolegend), anty-Gr1 Pacific Blue (Biolegend), anty-Ter119 Pacific Blue (Biolegend) i anty-CD31 PE-Cy7 (Biolegend). Po wyodrębnieniu pojedynczych i żywych komórek, makrofagi śledzionowe bramkowano jako populację komórek negatywną dla CD3, Gr1, B220 and Ter119, o wysokiej ekspresji CD45, F4/80 i umiarkowanej ekspresji CD11b. Komórki śródbłonna śledziony bramkowano jako populację negatywną dla CD45, o wysokiej ekspresji CD31.

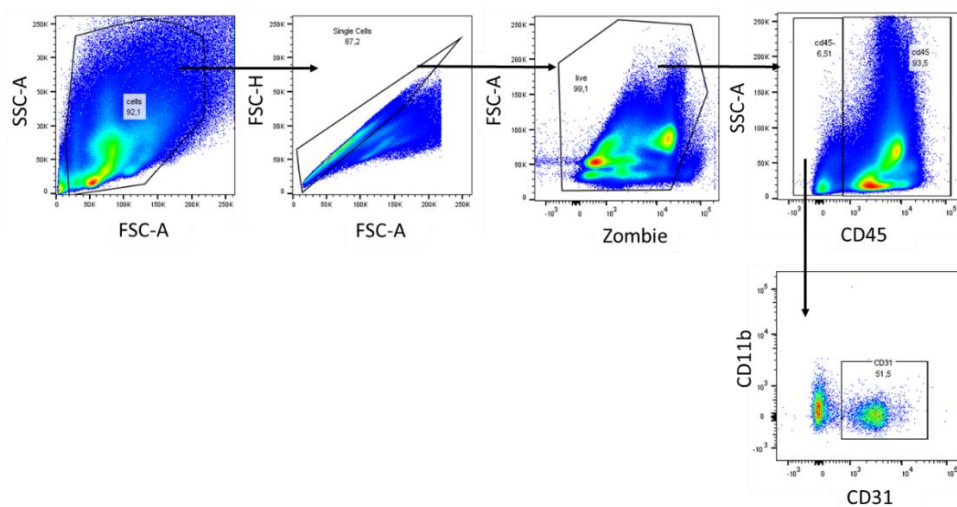
Komórki szpiku kostnego barwiono następującymi przeciwciałami znakowanymi fluorochromem: anty-CD45 PerCP (Biolegend), anty-CD11b BrilliantViolet 605 (Biolegend), anty-VCAM PE (Biolegend), anty-CD45R/B220 Pacific Blue (Biolegend), anty-CD3 Pacific Blue (Biolegend), anty-Gr1 Pacific Blue (Biolegend), anty-Ter119 Pacific Blue (Biolegend) i anty-CD31 PE-Cy7 (Biolegend). Po wyodrębnieniu pojedynczych i żywych komórek, makrofagi szpikowe bramkowano jako populację komórek negatywną dla CD3, Gr1, B220 and Ter119, o wysokiej ekspresji CD45, VCAM i umiarkowanej ekspresji CD11b. Komórki śródbłonna bramkowano jako populację negatywną dla CD45, o wysokiej ekspresji CD31.

Komórki aorty barwiono następującymi przeciwciałami znakowanymi fluorochromem: anti-CD45 PerCP (Biolegend) i anti-CD31 PE-Cy7 (Biolegend). Po wyodrębnieniu pojedynczych i żywych komórek, komórki śródbłonna bramkowano jako populację komórek negatywną dla CD45, o wysokiej ekspresji CD31.

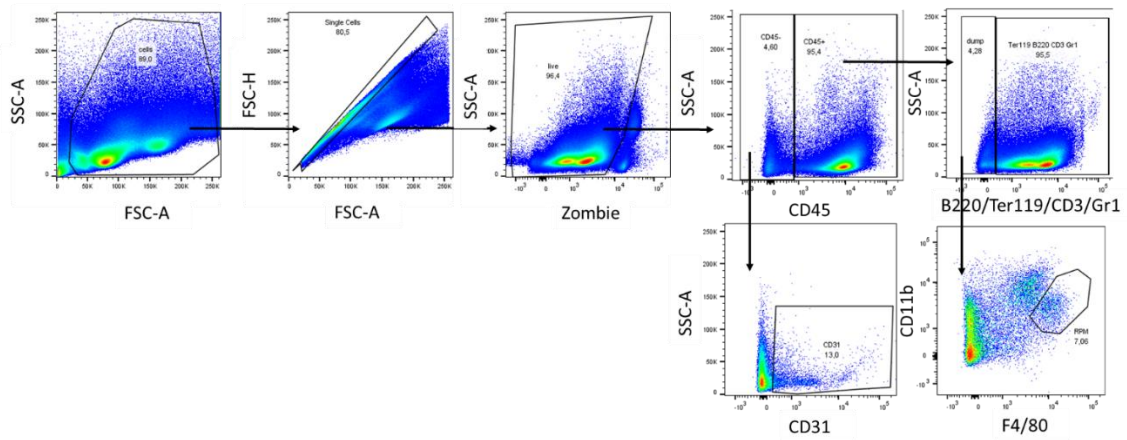
### A WĄTROBA



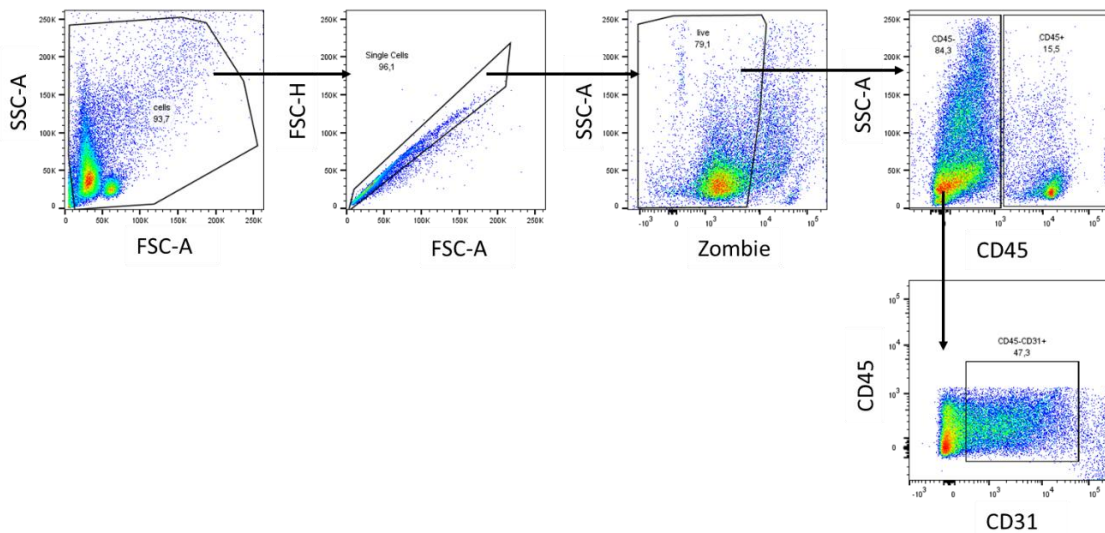
### B SZPIK KOSTNY



### C ŚLEDZIONA



### D AORTA



**Rycina 5. Strategia bramkowania populacji komórek wątroby (A), szpiku kostnego (B), śledziony (C) i aorty (D).** Komórki bramkowano na podstawie parametrów oceniających rozmiar i ziarnistość komórek-rozproszenia czołowego (ang. forward scatter, FSC) i rozproszenia bocznego (ang. side scatter, SSC). Następnie oddzielano komórki pojedyncze (FSC-H/FSC-A) oraz żywe na podstawie fluorescencji barwnika Zombie Aqua. Populacje komórek w poszczególnych narządach określano na podstawie fluorescencji odpowiednich przeciwciał (opis w tekście).

### 3.8 Hodowle pierwotne komórek wątroby

Myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej), wątroby poddawano perfuzji *in situ* (5 ml/minutę), przez żyłę główną po przecięciu żyły wrotnej, przy użyciu roztworu Liver Perfusion Medium (Gibco). Po 15 minutach, perfuzję kontynuowano przy użyciu roztworu Liver Digest Medium (Gibco) przez kolejne 15 minut. Następnie wątroby przenoszono do roztworu Hepatocyte Wash Medium (Gibco), rozdrabniano za pomocą 2 ml pipet serologicznych i filtrowano przez 100 µm sitka do separacji komórek. Zawiesinę komórek nieparenchymalnych trzykrotnie wirowano (50 rcf, 3 minuty) w celu oddzielenia osadu hepatocytów, nadsącz zawierający komórki nieparenchymalne przenoszono na lód. Roztwór nad osadu wirowano (750 rcf, 15 minut, 4°C), frakcję komórek nieparenchymalnych zawieszano w roztworze do lizy erytrocytów (Biolegend), inkubowano przez 5 minut i wirowano (750 rcf, 15 minut, 4°C). Komórki nieparenchymalne zawieszano w pożywce Williams E Medium (Sigma), zawierającym 10% FBS, 1% penicyliny/streptomycyny, 1% glutaminy (Gibco) oraz 10µg/ml insuliny (Sigma). Komórki nieparenchymalne wysiewano na płytkach 6-dołkowych uprzednio pokrytych kolagenem typu I (Corning), w ilości 300 000 komórek/dotek. Po upływie 3 godzin, komórki płukano dwukrotnie PBS i dodawano pożywkę Williams E Medium zawierającą 4% FBS, 1% penicyliny/streptomycyny i 1% glutaminy.

#### 3.8.1 Inkubacja komórek ze związkami drobnocząsteczkowymi

Komórki pierwotne wątroby hodowano w pożywce Williams E Medium zawierającej 4% FBS, poszczególne odczynniki dodawano do komórek 24h po wysianiu na płytki hodowlane. Fluorescencyjnie zabarwioną Hb (1µg/ml) i kompleks Hb:Hp (1µg Hb/ml) dodawano do komórek na 1h.

W celu zbadania procesu makropinocytozy, komórki preinkubowano z inhibitorami wymienionymi w Tabeli 1. Następnie, dodawano do komórek fluorescencyjnie zabarwioną Hb (1µg/ml) i inkubowano 10 minut. Komórki kontrolne inkubowano z DMSO. Następnie komórki płukano PBS, odklejano za pomocą roztworu akutazy (Gibco),

wirowano (500 rcf, 5 minut, w temperaturze pokojowej), barwiono i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej.

**Tabela 1.** Inhibitory wykorzystane w hodowli komórek.

INHIBITOR	Producent	Czas inkubacji	Stężenie końcowe	Działanie
Chloropromazina (CPZ)	Sigma-Aldrich	1 h	2 $\mu$ M	inhibitor endocytozy klatrynozależnej
EIPA	MedChemExpress	1 h	25 $\mu$ M	inhibitor makropinocytozy
Latrunkulina-A LAT-A	Tocris	30 min	1 $\mu$ M	inhibitor polimeryzacji aktyny
ML 141	Selleckhem	1 h	10 $\mu$ M	inhibitor GTPazy Cdc42
PRI-724	Selleckhem	24 h	5 $\mu$ M	inhibitor $\beta$ -kateniny
Dextran	Thermo Scientific	1 h	1 mg/ml	marker makropinocytozy

### 3.9 Przygotowanie RBC poddanych szokowi cieplnemu

Myszy uśmiercono przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli fizjologicznej). Następnie krew pobrano poprzez nakłucie serca, zawieszono w 10% roztworze CPDA-1 (Sigma-Aldrich) i zwirowano (400 rcf, 15 minut, 4°C). Plazmę filtrowano przez 0.1  $\mu$ m filtr i przechowywano w 4°C. Erytrocyty zawieszono w buforze HBSS i oczyszczono z leukocytów przy użyciu Lymphosep (Biowest). Komórki płukano buforem HBSS i inkubowano w temperaturze 48°C przez 30 minut z jednoczesnym wytrząsaniem. Do barwienia erytrocytów wykorzystano zestaw PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit (Sigma-Aldrich).  $1 \times 10^{10}$  erytrocytów zawieszono w 1 ml rozpuszczalnika i zmieszano z kolejnym 1ml rozpuszczalnika zawierającego 4  $\mu$ M barwnika PKH-67. Mieszaninę poddano inkubacji w ciemności, w 37°C przez 5 minut. Następnie reakcję zatrzymano dodając 10 ml buforu HBSS zawierającego 2% FCS i 0.5% BSA. Erytrocyty płukano dwukrotnie buforem HBSS i rozcieńczano uprzednio pobraną plazmą, tak aby hematokryt wynosił 50%. Powyższa procedura wykonywana była we współpracy z mgr. Patrykiem Ślusarczykiem z Laboratorium Homeostazy Żelaza w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Mysiom podawano dożylnie 100  $\mu$ l erytrocytów. Po godzinie myszy uśmiercano przez przedawkowanie środków znieczulających (mieszanina Ketamina/Ksylazyna w soli

fizjologicznej), płaty wątroby pobrano i perfundowano PBS za pomocą pompy perystaltycznej i izolowano komórki nieparenchymalne jak opisano w podrozdziale 3.6.1.

### 3.10 Immunofluorescencja

#### 3.10.1 Zbadanie pobierania Hb *in vitro* w hodowli pierwotnych komórek wątroby

Po 3 godzinach inkubacji w Williams E Medium bez FBS, do pierwotnych komórek wątroby dodawano Hb-AF647 (1 µg/ml) na 1 godzinę. Następnie komórki wyplukano PBS, utrwalono w 4% roztworze paraformaldehydu i permeabilizowano w 0.1% roztworze Triton X-100. Niespecyficzne wiązanie się przeciwciał blokowano PBS zawierającym 5mg/ml BSA przez 1 h w temperaturze pokojowej. Komórki barwiono przeciwciałami anti-Stab2 1:100 (St John's Laboratory) i anti-F4/80 1:100 (Biolegend) przez noc w 4°C. Następnie komórki płukano PBS, a jądra komórkowe wybarwiono DAPI (Thermo Fisher). Preparaty obrazowano przy użyciu aparatu Opera Phenix Plus High-Content Screening System we współpracy z dr. Kamilem Jastrzębskim z Laboratorium Biologii Komórki w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

#### 3.10.2 Zbadanie pobierania Hb przez komórki LSEC i KC za pomocą barwienia immunohistochemicznego

Wątrobę pobraną od myszy po 1 godzinie od iniekcji dożylną Hb-AF647 utrwalano w 4% paraformaldehydzie w 4°C przez 24 godziny. Tkanki płukano PBS (3 x 30 minut) i moczo w 12,5%, następnie w 25% sacharozie, odpowiednio przez 1,5h i 48h. Próbki wątroby zatapiano w pożywce Cryomatrix (Epredia™), zamrażano w ciekłym azocie, cięto na skrawki 10 µm przy użyciu kriomikrotomu (Leica) i przechowywano w -20°C. Przed barwieniem skrawki pozostawiono w temperaturze pokojowej na 30 minut, obrysowane Pap Pen Liquid Blocker (Ted Pella), następnie płukano w PBS przez 10 minut i permeabilizowano PBS/0,1% Triton X-100 (Thermo Fisher) przez 20 minut. Następnie skrawki inkubowano w PBS/3% BSA (Bioshop) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Do wykrywania komórek LSEC, tkanki barwiono przeciwciałem anti-CD146 (Biolegend), natomiast w celu wykrycia

komórek Kupffera, tkanki barwiono przeciwciałem anti-F4/80 (Biolegend). Przeciwciał używano w rozcieńczeniu 1:100 w PBS/3% BSA i tkanki barwiono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Hemoglobina była skoniugowana z barwnikiem Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher). Po inkubacji przeciwciał tkanki przemywano PBS/0,1% Triton X-100 (5 x 5 minut) w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała. Do barwienia jąder, skrawki inkubowano z Hoechst 33342 (Thermo Fisher) rozcieńczonym w PBS/0,1% Triton X-100 (stężenie końcowe – 1 µg/ml) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki płukano PBS/0,1% Triton X-100 (3 x 5 minut), inkubowano w PBS przez 10 minut i zamykano za pomocą ProLong™ Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher). Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 800 przy użyciu obiektywu × 40 i oprogramowania Fiji. 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.

### 3.10.3 Obrazowanie makropinosomów za pomocą mikroskopu konfokalnego

Z zawiesiny komórek nieparenchymalnych usunięto makrofagi za pomocą kulek magnetycznych anti-F4/80 (Anti-F4/80 MicroBeads UltraPure, mouse, Miltenyibiotec) wg. protokołu producenta. Następnie komórki wysiewano na okrągłe szkiełka nakrywkowe pokryte kolagenem (Corning) i utrwalano w 4% PFA przez 10 minut w 4°C, po czym płukano PBS. Następnie komórki permeabilizowano i blokowano przez 10 minut (temp. pokojowa) w roztworze PBS zawierającym 0.1% saponiny, 0.2% żelatyny i 5 mg/ml BSA. Po etapie blokowania, komórki inkubowano w roztworze PBS zawierającym 0.01% saponiny, 0.2% żelatyny i przeciwciało anti-EEA1 1:1000 (Enzo Life Sciences), przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie komórki płukano i inkubowano z drugorzędowym oślim przeciwciałem anti-króliczym IgG sprzężonym z AF-488 1:500 (Thermo Fisher Scientific), 1h w temperaturze pokojowej. Falloidynę sprzężoną z fluorochromem Atto 390 1:500 (Sigma), która barwi spolimeryzowaną aktynę, dodano do roztworu podczas barwienia przeciwciałem drugorzędowym. Komórki płukano PBS i przyklejano na szkiełka podstawowe przy użyciu odczynnika Moviol (Sigma). Preparaty obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 i analizowano w programach Fiji i ZEN 2011. Obrazowanie makropinosomów wykonano we współpracy z mgr. Martą Chwałek

z Laboratorium Biologii Komórki w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

### 3.11 Pomiar ekspresji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Izolację RNA przeprowadzano stosując odczynnik TRIzol™ (Thermo Scientific) do tkanek i odczynnik TRIzol™ LS (Thermo Scientific) do wysortowanych komórek, zgodnie z protokołami producenta. Czystość oraz stężenie RNA oceniano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 400 ng RNA, 1 µl zestawu starterów oraz wody wolnej od nukleaz do całkowitej objętości 17,7 µl, mieszaninę inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 minut i schładzano do 4°C. Mieszaninę reakcyjną, która zawierała 0,3 µl odwrotnej transkryptazy RevertAid H Minus (Thermo Scientific), 1 µl 10 mM roztworu dNTP i 5 µl buforu reakcyjnego, dodawano do całkowitej objętości reakcji 25 µl, reakcję prowadzono w 42°C przez 60 minut. Otrzymany cDNA rozcieńczano 9-krotnie i używano do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR). Do reakcji qPCR używano 4 µl cDNA, 7,5 µl SG qPCR Master Mix (2x) (Eurex), 1,5 µl 5 µM roztworu starterów FORWARD i REVERSE oraz wody wolnej od nukleaz do końcowej objętości reakcji 15 µl. qPCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu systemu LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche) z etapem wstępnej inkubacji w temperaturze 95°C przez 600 s, a następnie dwuetapowym 40-cyklowym protokołem amplifikacji (95°C 15 s, 60°C 60 s). Eksperyment został przeprowadzony we współpracy z mgr. Gabrielą Żurawską z Laboratorium Homeostazy Żelaza w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

**Tabela 2. Startery wykorzystane w reakcji qPCR.**

Gen	Starter Fw (5'→3')	Starter Rev (5'→3')
<i>Ccl2</i>	CATCCACGTGTTGGCTCA	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
<i>Cd163</i>	TCACTTCTCAGTGCCTCTGC	CGCCAGTCTCAGTTCCTTCT
<i>Hmox-1</i>	AGGCTAAGACCGCCTTCT	TGTGTTCTCTGTGAGCATCA



### 3.12 Pomiar biodystrybucji Hb-AF750 w organach *ex vivo*

Aby ocenić dystrybucję tkankową Hb w organach, myszom podano dożylnie 10 µg Hb-AF750. Po 1 godzinie myszy uśmiercono i wypreparowano następujące organy: wątrobę, śledzionę, nerki, płuca i serce. W celu monitorowania fluorescencji Hb-AF750 wypreparowane organy ułożono na szalce Petriego i poddano obrazowaniu. Całkowita fluorescencja w kanale obejmującym spektrum AF750 została zmierzona za pomocą aparatu do bio-obrazowania Bruker *in vivo*-FX-PRO stosując oryginalne oprogramowanie producenta. W celu pomiaru fluorescencji, zaznaczono organy jako wybrane obszary zainteresowania (ang. Region Of Interest, ROI) i wygenerowano wartości średniej fluorescencji dla każdego organu. Eksperyment wykonano w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

### 3.13 Pomiar biodystrybucji Hb znakowanej <sup>131</sup>I

#### 3.13.1 Przygotowanie <sup>131</sup>I-Hb

Reakcję jodowania prowadzono w obecności czynnika utleniającego IODO-GEN (1,3,4,6-tetrachloro-3α,6α-difenyloglikolurylu). Do próbki pokrytej czynnikiem utleniającym dodano kolejno: 200 µl [<sup>131</sup>I]NaI, 37 µl Hb (o stężeniu 136 mg/ml) wyizolowanej jak opisano w podrozdziale 3.2 oraz 263 µl PBS. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 122 minuty. Następnie mieszaninę oczyszczono dwukrotnie na koncentratorze Vivaspin 500 o MWCO 10 kDa (6000 rcf, 10minut). Po wirowaniu filtr wypłukano PBS. Następnie wykonano pomiary masy preparatu, stężenia białka, aktywności i czystości uzyskanego produktu. Czystość otrzymanego produktu wyznaczono techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Stężenie białka zmierzono techniką UV-VIS za pomocą spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Aktywność radiokoniugatów oznaczono w komorze jonizacyjnej AtomLab 500. Próbkę umieszczono w 4°C na noc. Eksperyment został przeprowadzony we współpracy z mgr. Łukaszem Chedą z grupy badawczej Radiochemia dla Medycyny i Przemysłu w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Pomiar aktywności izotopu <sup>131</sup>I wykonano w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie.

### 3.13.2 Podanie i pomiar aktywności $^{131}\text{I}$ -Hb

Myszom podano dożylnie  $^{131}\text{I}$ -Hb (10  $\mu\text{g}$ ). Po 1 godzinie myszy uśmiercono poprzez dyslokację kręgów poprzedzoną sedacją z wykorzystaniem izofluranu. Wypreparowano następujące narządy: wątrobę, śledzionę, nerki, kość udową oraz aortę. Pobrane organy ważono i przekazano do Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w celu pomiaru aktywności  $^{131}\text{I}$ . Aktywność preparatu podanego zwierzętom oraz związanego w tkankach zmierzono powtarzając trzykrotnie pomiar, o czasie akwizycji 60 sekund, z wykorzystaniem automatycznego licznika gamma WIZARD2 2480 (PerkinElmer).

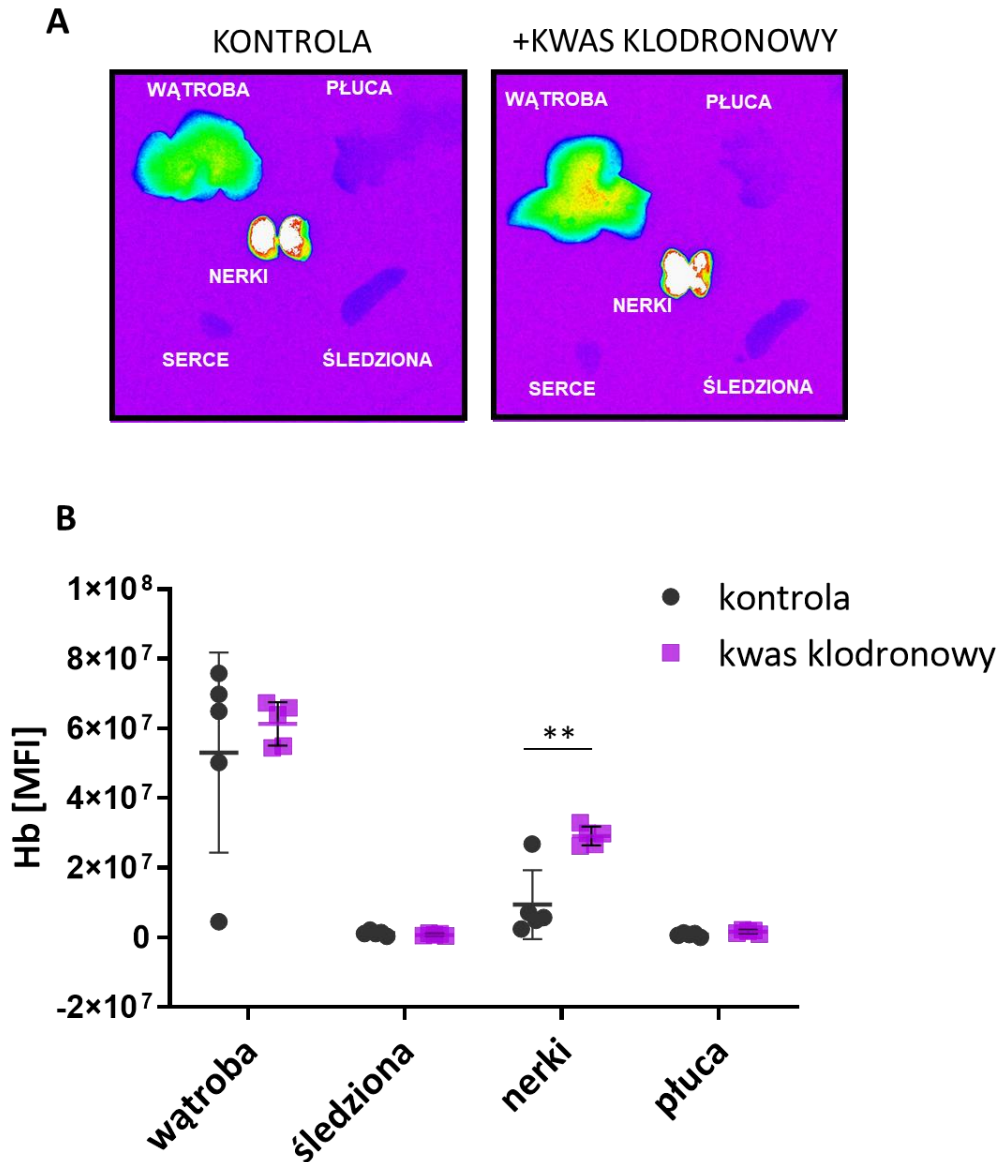
### 3.14 Analiza statystyczna

Dane przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD. Liczbę myszy/próbek na grupę przedstawiono na rycinach. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 9. Gdy porównywano dwie grupy, zastosowano test t-Studenta, podczas gdy dla większej liczby grup przeprowadzono 1-czynnikowy test ANOVA z rozszerzeniem Tukeya dla porównań wielokrotnych, jak wskazano w opisach rycin. Istotne statystycznie zmiany między średnimi oznaczano gwiazdkami w zależności od wartości: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , brak istotności statystycznej oznaczano: ns. Do przygotowania rycin wykorzystano program BioRender.

## 4. Wyniki

### 4.1 Zbadanie biodystrybucji Hb u myszy po usunięciu makrofagów

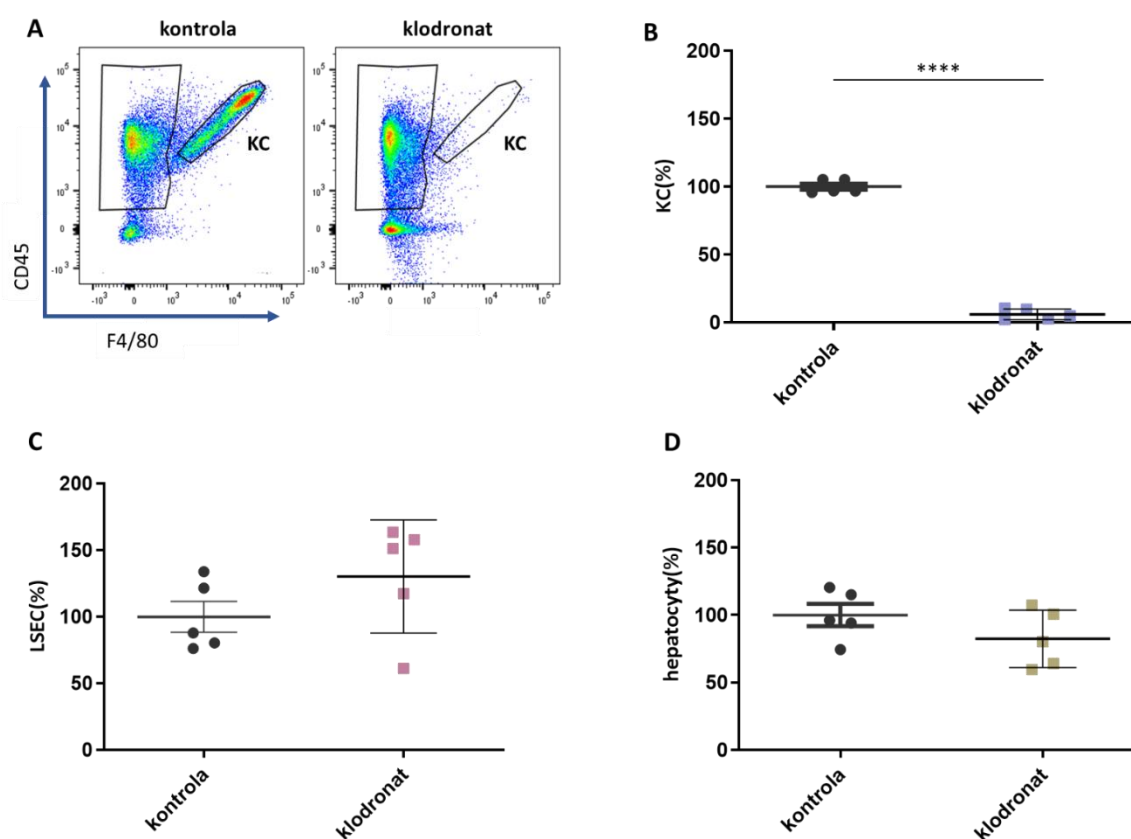
W celu zbadania zaangażowania makrofagów w wychwyt wolnej Hb, porównano dystrybucję Hb u myszy po deplecji makrofagów i u myszy kontrolnych. Wykorzystano powszechnie stosowaną metodę usunięcia makrofagów za pomocą dożylnego podania liposomów zawierających toksyczny dla komórek fagocytujących kwas klodronowy. Najpierw dokonano deplecji makrofagów za pomocą liposomów zawierających kwas klodronowy (5 ml/kg), myszom kontrolnym podawano kontrolne liposomy bez kwasu klodronowego. Po 24 godzinach od deplecji, wyznakowaną fluorescencyjnie hemoglobinę Hb-AF750 (10 µg/mysz) podawano dożylnie. Aby ocenić dystrybucję tkankową Hb-AF750, myszy uśmiercono po 1 godzinie od nastrzyknięcia i wypreparowano następujące organy: wątrobę, śledzionę, nerki i płuca. Całkowita fluorescencja w kanale obejmującym spektrum AF750 została zmierzona za pomocą aparatu do bio-obrazowania Bruker *in vivo*- FX-PRO. Wyniki obrazowania wykazały największy sygnał dla Hb w wątrobie i w nerkach w porównaniu z sercem, płucami i śledzioną (Ryc. 6A). Wedle przewidywań najwyższy poziom fluorescencji pochodzącej z wyznakowanej Hb-AF750 został odnotowany w wątrobie. Nieoczekiwanie, zaobserwowano brak spadku sygnału w wątrobie pomimo deplecji makrofagów (Ryc. 6B). Wynik ten sugeruje, że inna populacja komórek poza makrofagami wątrobowymi (KC) jest odpowiedzialna za wychwyt Hb, a potencjalnym kandydatem są komórki śródbłonna zatok (LSEC).



**Rycina 6.** Dystrybucja tkankowa podanej dożylnie Hb u myszy po deplecji makrofagów. Mysiom kontrolnym i myszom, którym wcześniej usunięto makrofagi za pomocą kwasu kłodronowego, wstrzyknięto 10  $\mu\text{g}$  Hb-AF750, 1 godzinę później, myszy uśmiercono, wyizolowano narządy i zmierzono ich fluorescencję za pomocą aparatu Bruker *in vivo* FX-PRO **A.** reprezentatywne wyniki obrazowania organów *ex vivo* dla myszy kontrolnej i po usunięciu makrofagów kwasem kłodronowym. **B.** Wykres przedstawia średnią fluorescencję Hb (MFI) w poszczególnych organach  $\pm$  SD (n=5). \*\*<0.01 w odniesieniu do kontroli (test t-Studenta).

Aby potwierdzić deplecję makrofagów z wątroby (z myszy po procedurze opisanej w wynikach przedstawionych na rycinie 6 A-B) organy zostały rozdysocjowane do zawiesiny pojedynczych komórek poprzez proces enzymatycznej i mechanicznej obróbki. Następnie komórki zabarwiono przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie

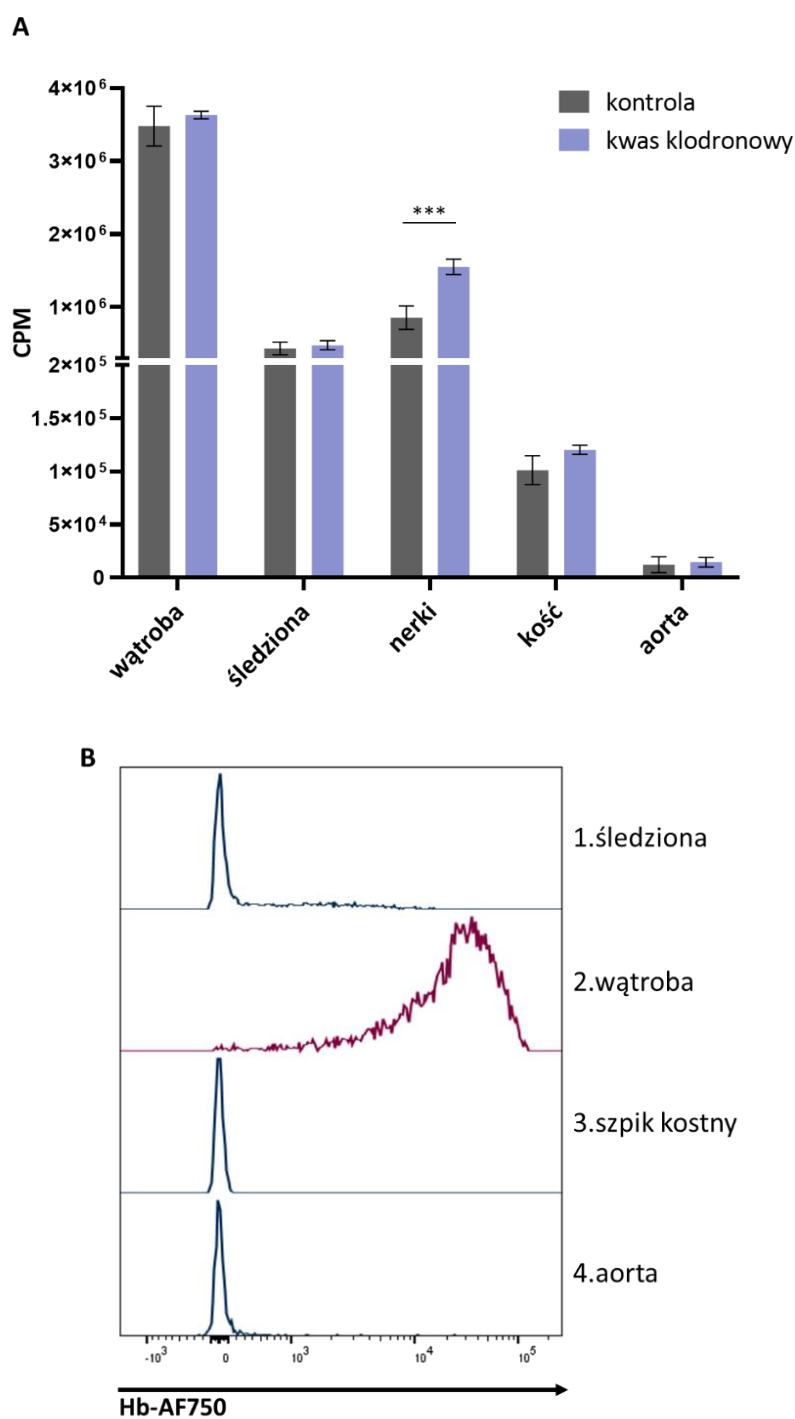
i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Spośród komórek wątroby wyróżniono trzy główne populacje: KC ( $CD45^+F4/80^+CD11b^+$ ), LSEC ( $CD45^+Stab2^+CD146^+$ ) oraz hepatocyty (scharakteryzowane na podstawie parametrów SSC i FSC określających ziarnistość i wielkość komórek). Analiza cytometryczna potwierdziła skuteczną deplecję makrofagów (Ryc. 7 A-B). Jednocześnie zabieg ten nie miał istotnego wpływu na liczebność pozostałych dominujących populacji komórek LSEC (Ryc. 7C) i hepatocytów (Ryc. 7D).



**Rycina 7. Weryfikacja deplecji makrofagów w wątrobie przy użyciu liposomów kwasu klodronowego.** Mysiom podano dożylnie liposomalny kwas klodronowy (5 mg/kg), grupa kontrolna otrzymała puste liposomy kontrolne. Po 24 godzinach myszy uśmiercono, wątroby wypreparowano i zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-CD11b, anti-F4/80, anti-CD146 oraz anti-Stab2, następnie analizowano za pomocą cytometrii przepływowej w celu potwierdzenia deplecji makrofagów. **A.** Na rycinie przedstawiono przykładowe wykresy przedstawiające populacje KC w grupie kontrolnej i grupie badanej. Na wykresach przedstawiono normalizowaną średnią wartość procentową  $\pm$  SD ( $n=5$ ) **(B)** komórek KC, **(C)** komórek LSEC oraz **(D)** hepatocytów w grupie kontrolnej i w grupie badanej. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  względem grupy kontrolnej (test t-Studenta).

#### 4.1.1 Zbadanie biodystrybucji Hb w komórkach śródbłonek zatokowych w różnych organach

W kolejnym etapie biodystrybucję Hb zbadano w różnych organach, w których obecny jest śródbłonek zatok, z wykorzystaniem Hb wyznakowanej izotopem  $^{131}\text{I}$ . Mysiom po deplecji makrofagów i myszom kontrolnym podano dożylnie  $^{131}\text{I}$ -Hb (10  $\mu\text{g}/\text{mysz}$ ). Po upływie 1 godziny, myszy uśmiercono i wypreparowano następujące organy: wątrobę, śledzionę, nerki, aortę i kość udową. Pobrane organy zostały zważone i przekazane do Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w celu pomiaru aktywności izotopu  $^{131}\text{I}$ . Wyniki ponownie wykazały najwyższy poziom sygnału  $^{131}\text{I}$ -Hb w wątrobie (Ryc. 8A). Nie zaobserwowano różnicy w sygnale po dodaniu kwasu klodronowego, co potwierdza wyniki otrzymane z fluorescencyjnie wyznakowaną Hb i sugeruje, że makrofagi nie są główną populacją odpowiedzialną za wychwyt Hb w wątrobie. Dodatkowo, wychwyt fluorescencyjnie wyznakowanej Hb przez komórki śródbłonek zatokowych ze śledziony, wątroby i szpiku kostnego zbadano za pomocą cytometrii przepływowej. Kontrolnie, zbadano także śródbłonek nie-zatokowy z aorty. Mysiom podano dożylnie Hb-AF750 (10  $\mu\text{g}/\text{mysz}$ ) na 1 godzinę. Po tym czasie, myszy uśmiercono, organy wypreparowano i poddano obróbce w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Następnie komórki zabarwiono przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki śródbłonek zatok śledziony, szpiku kostnego i śródbłonek aorty scharakteryzowano jako  $\text{CD45}^- \text{CD31}^+$ , natomiast komórki śródbłonek zatok wątroby, czyli LSEC, jako  $\text{CD45}^+ \text{Stab2}^+ \text{CD146}^+$ . Najwyższy poziom fluorescencji Hb zaobserwowano w komórkach LSEC w porównaniu do śródbłonek zatok pozostałych organów i kontrolnego śródbłonek aorty (Ryc. 8B).

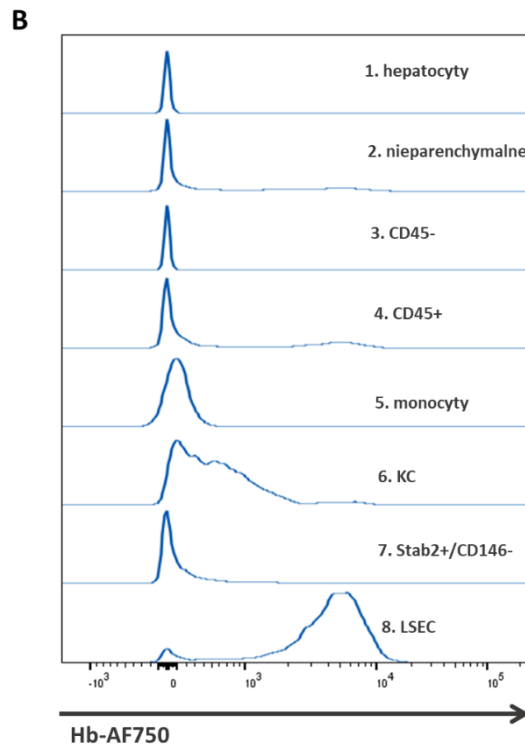
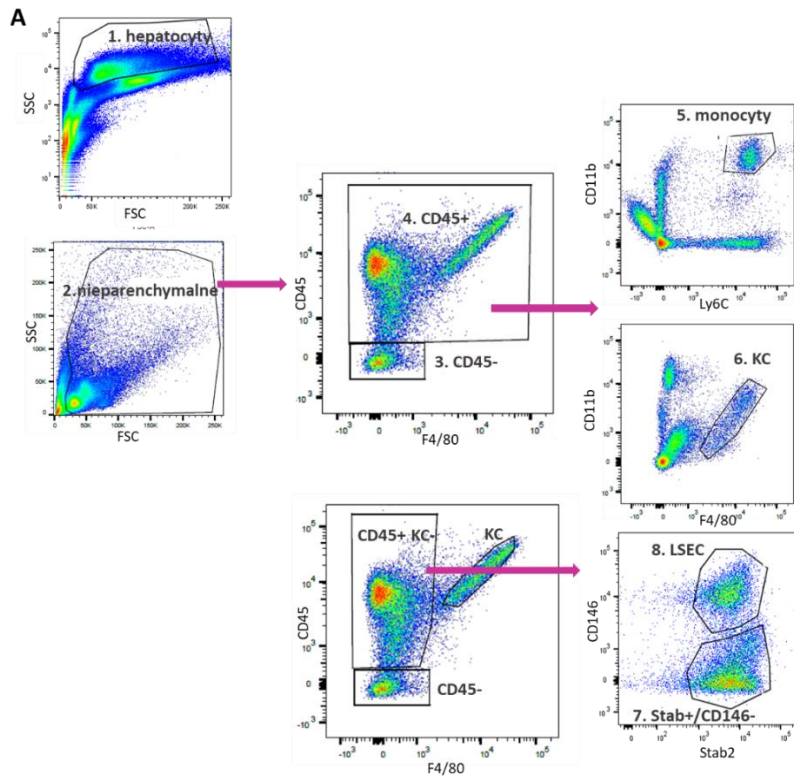


**Rycina 8. Wychwyt Hb przez organy posiadające komórki śródbłonka zatok.** **A.** Mysiom kontrolnym i mysiom, którym wcześniej usunięto makrofagi za pomocą kwasu kłodronowego, wstrzyknięto  $^{131}\text{I}$ -Hb, 1 godzinę później wyizolowano narządy i wykonano w nich pomiar aktywności izotopu  $^{131}\text{I}$ . Na wykresie przedstawiono średnią z 3 pomiarów CPM (counts per minute)  $\pm$  SD ( $n=4-5$ ) dla poszczególnych organów.  $***<0.001$  względem grupy kontrolnej (test t-Studenta). **B.** Reprezentatywne histogramy przedstawiające wychwyt Hb-AF750 przez różne populacje komórek. Mysiom podano dożylnie Hb-AF750, po 1 godzinie wątroby wypreparowano, perfundowano, barwiono i poddano analizie metodą cytometrii przepływowej. Zawartość Hb analizowano w komórkach śródbłonka zatok: **(1)** śledziony ( $\text{CD45}^-\text{CD31}^+$ ), **(2)** wątroby-LSEC ( $\text{CD45}^+\text{Stab2}^+\text{CD146}^+$ ), **(3)** szpiku kostnego ( $\text{CD45}^-\text{CD31}^+$ ) i **(4)** w komórkach nie-zatokowego śródbłonka aorty ( $\text{CD45}^-\text{CD31}^+$ ).

## 4.2 Charakterystyka populacji komórek wątroby odpowiedzialnych za wychwyt Hb

Celem kolejnego doświadczenia było potwierdzenie roli populacji nieparenchymalnych komórek wątroby w wychwycie Hb. Akumulacja wolnej Hb została porównana zarówno we frakcji parenchymalnej (hepatocytach), jak i nieparenchymalnej (LSEC, komórki immunologiczne) po upływie 1 godziny. Do określenia populacji komórek w wątrobie wykorzystano cytometrię przepływową. Mysiom podano dożylnie Hb-AF750 (10 µg/mysz) na 1 godzinę, następnie myszy uśmiercono. Z wypreparowanych wątrób wyizolowano komórki nieparenchymalne i hepatocyty jak opisano w podrozdziale 3.6.1. Wśród komórek nieparenchymalnych scharakteryzowano 3 główne populacje: KC (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) monocyty (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) i LSEC (CD45<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>). Hepatocyty scharakteryzowano na podstawie parametrów SSC i FSC określających ziarnistość i wielkość komórek. Aby szczegółowo określić populację komórek odpowiedzialną za najbardziej efektywny wychwyt wolnej Hb, akumulację Hb-AF750 obserwowano w następujących populacjach komórek: parenchymalnych, wszystkich nieparenchymalnych, CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, monocytach, KC, Stab<sup>+</sup> CD146<sup>-</sup> oraz LSEC (Ryc. 9A-B). Zaobserwowano, że w porównaniu z innymi populacjami komórek wątroby komórki LSEC wykazywały się najwyższym poziomem fluorescencji pochodzącym z Hb.

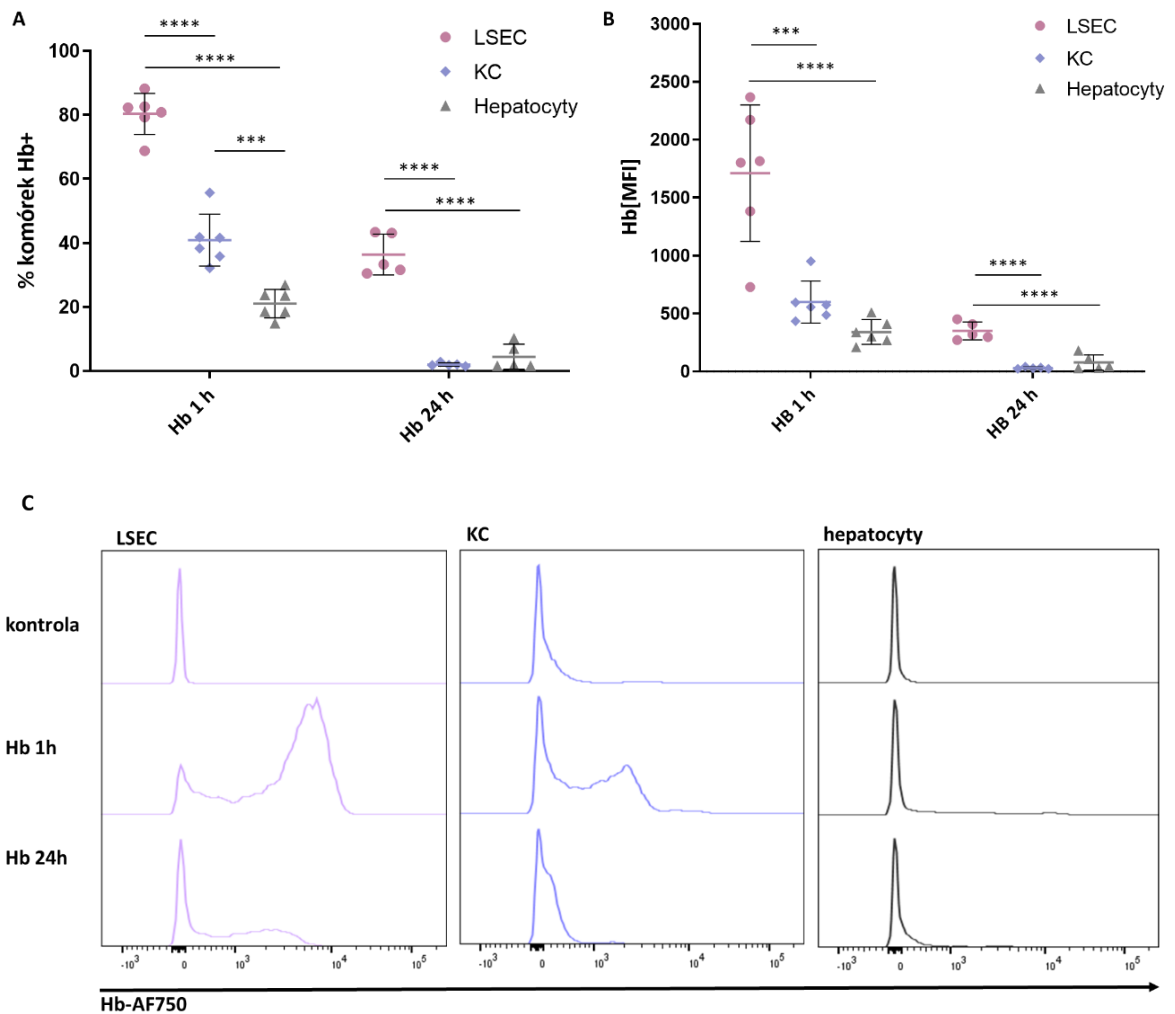




**Rycina 9. Wychwył Hb przez poszczególne populacje komórek wątroby.** Mysiom wstrzykiwano dożylnie Hb-AF750 (10  $\mu$ g/mysz). 1 godzinę później wątroby wycinano, perfundowano, barwiono i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. **A.** Schemat bramkowania populacji komórek. **B.** Reprezentatywne histogramy przedstawiające wychwył Hb przez różne populacje komórek wątroby: **(1)** parenchymalne [hepatocyty] i **(2)** komórki nieparenchymalne. Spośród komórek nieparenchymalnych wyróżniono: **(3)** komórki CD45<sup>-</sup>, **(4)** komórki CD45<sup>+</sup>, **(5)** monocyty, **(6)** komórki Kupffera, **(7)** komórki Stab<sup>+</sup>CD146<sup>-</sup> oraz **(8)** komórki LSEC.

### 4.3 Zbadanie pobierania Hb w czasie przez główne populacje komórek w wątrobie

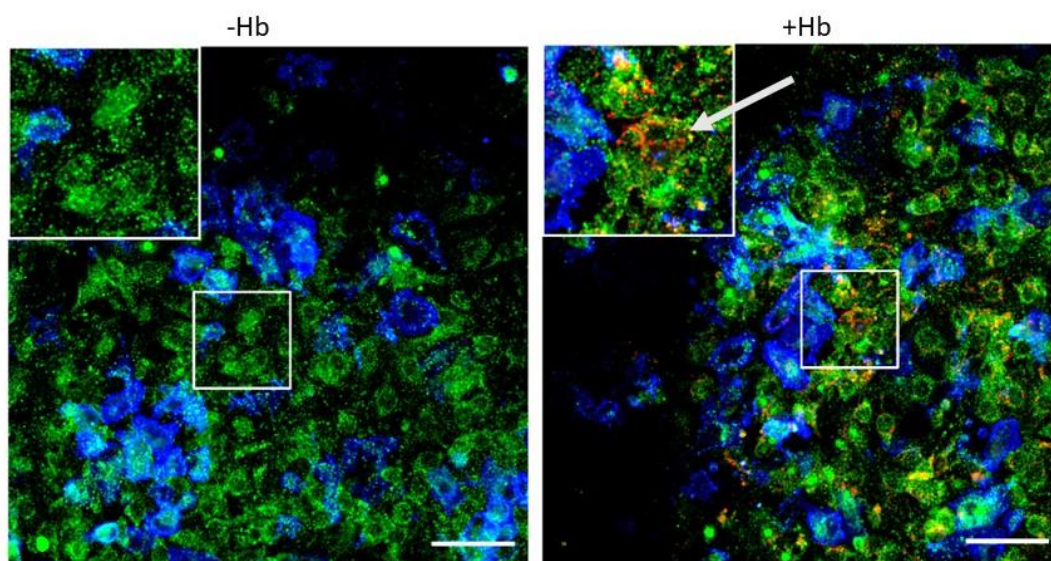
W kolejnym doświadczeniu zbadano pobieranie Hb w czasie przez trzy główne populacje komórek wątroby: LSEC, KC i hepatocyty. Akumulację Hb-Af750 (10 µg/mysz) podanej dożylnie mierzono w dwóch punktach czasowych po upływie 1 i 24 godzin za pomocą cytometrii przepływowej. Z wypreparowanych wątrób wyizolowano komórki nieparenchymalne i hepatocyty jak opisano w podrozdziale 3.6.1. Wśród komórek nieparenchymalnych scharakteryzowano następujące populacje: KC (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) i LSEC (CD45<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>). Odsetek komórek LSEC pozytywnych dla Hb z czasem spadł o połowę - z średnio 80% do 40%, w przypadku KC z średnio 40% do 2% i w hepatocytach z średnio 20% do 2% (Ryc. 10A). Zaobserwowano spadek średniej fluorescencji Hb wraz z czasem dystrybucji we wszystkich typach badanych komórek (Ryc. 10B-C). LSEC wychwyciły wolną Hb z najwyższą wydajnością w porównaniu z KC i hepatocytami w obydwóch punktach czasowych.



**Rycina 10. Kinetyka pobierania Hb przez główne populacje komórek wątroby.** Mysiom wstrzykiwano dożylnie Hb-AF750. Po upływie 1 i 24 godzin wątroby wypreparowano, perfundowano, barwiono i komórki poddano analizie metodą cytometrii przepływowej. Zawartość Hb analizowano w komórkach LSEC (CD45<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>), KC (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) i hepatocytach. **A.** Na wykresach przedstawiono średnią wartość procentową  $\pm$  SD (n=5-6) komórek pozytywnych na Hb i **B.** średnią fluorescencję  $\pm$  SD Hb (MFI) w LSEC, KC i hepatocytach \*\*\*<0.001 \*\*\*\*<0.0001 (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a). **C.** Reprezentatywne histogramy Hb w LSEC, KC i hepatocytach .

#### 4.4 Zbadanie wychwytu Hb *in vitro* w hodowli pierwotnych komórek wątroby

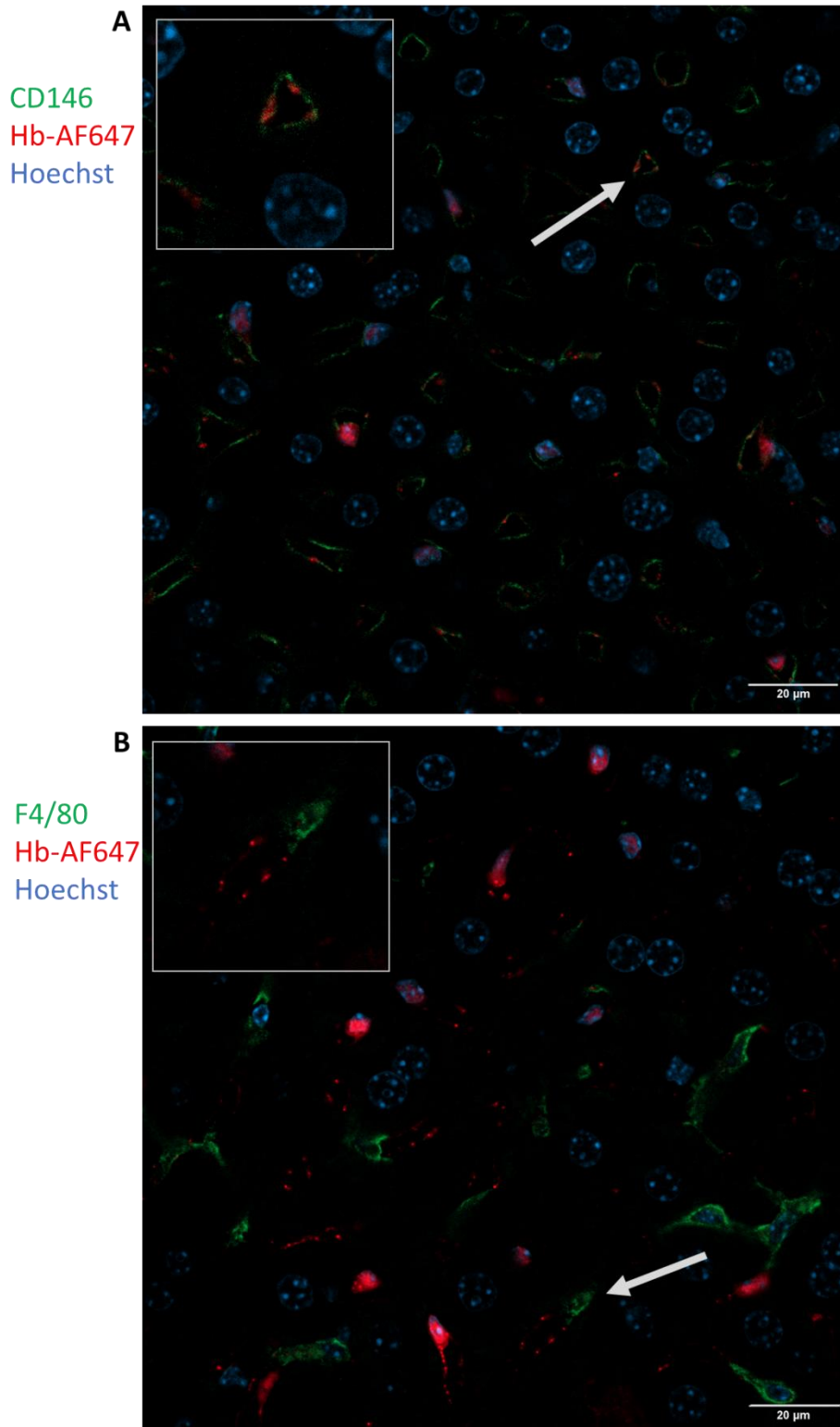
W kolejnym doświadczeniu sprawdzono pobieranie Hb *in vitro* w hodowli pierwotnych komórek wątroby. Hodowle pierwotne komórek wątroby prowadzone były jak opisano w podrozdziale 3.8. Po 3 godzinach inkubacji w Williams E Medium bez FBS, do komórek dodawano Hb-AF647 (1µg/ml) na 1 godzinę. Następnie komórki wypłukano PBS, utrwalono w 4% roztworze paraformaldehydu i permeabilizowano w 0.1% roztworze Triton X-100. Komórki barwiono przeciwciałami anti-Stab2 i anti-F4/80, aby rozróżnić komórki LSEC i KC. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (Thermo Fisher) i preparaty obrazowano przy użyciu aparatu Opera Phenix Plus High-Content Screening System. W komórkach LSEC (kolor zielony) zaobserwowano większy sygnał pochodzący od Hb-AF750 (kolor czerwony) niż w KC (kolor niebieski) (Ryc. 11).



**Rycina 11. Wychwył Hb przez komórki LSEC *ex vitro* w hodowli pierwotnych komórek wątroby.** Do komórek dodawano Hb-AF647 (1µg/ml) na 1 godzinę, następnie komórki barwiono przeciwciałami anti-Stab2 i anti-F4/80 i obrazowano przy użyciu aparatu Opera Phenix Plus High-Content Screening System. Kolor zielony-LSEC, kolor niebieski-KC, kolor czerwony-Hb. Strzałka wskazuje przykładową komórkę LSEC, która pobrała Hb. Skala przedstawia 10 µm.

#### 4.5 Zbadanie pobierania Hb przez komórki LSEC i KC za pomocą barwienia immunohistochemicznego

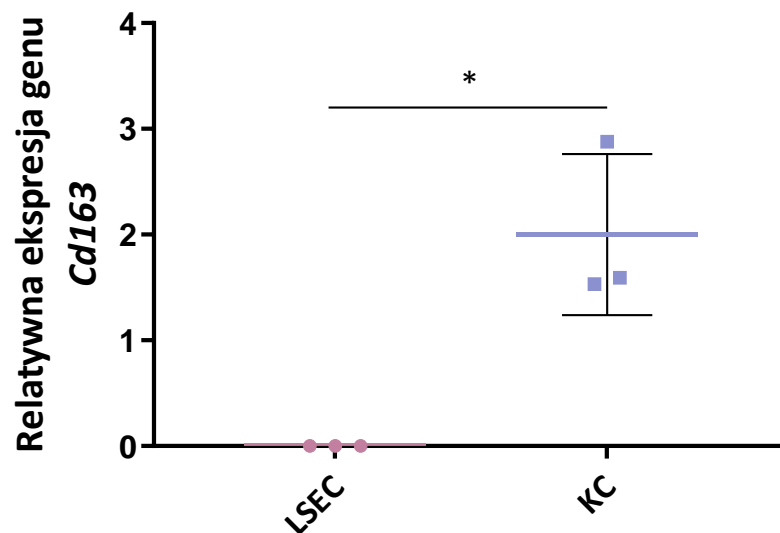
W celu potwierdzenia pobierania wolnej Hb przez komórki LSEC i KC wykonano barwienie immunohistochemiczne skrawków wątroby pobranych po 1 h od nastrzyknięcia dożylnego Hb. Preparaty przygotowano jak opisano w podrozdziale 3.10.2. W celu wykrycia komórek LSEC, komórki barwiono przeciwciałem anty-CD146, komórki KC zabarwiono przeciwciałem anty-F4/80. Analiza potwierdziła występowanie sygnału pochodzącego z Hb-AF647 (kolor czerwony) zarówno w komórkach LSEC (CD146+) (Ryc. 12A) jak i KC (F4/80+) (Ryc. 12B). Ilościowa wartość sygnału w poszczególnych komórkach nie była analizowana.



**Rycina 12. Pobieranie Hb przez komórki LSEC i KC.** Mysiom podano dożylnie Hb-AF647 (10  $\mu$ g) lub PBS na 1 godzinę, następnie wątroby wycięto i przygotowano preparaty histologiczne. **A.** Komórki LSEC barwiono przeciwciałem anti-CD146 (kolor zielony); **B.** KC barwiono przeciwciałem anti-F4/80 (kolor zielony). Kolor czerwony- Hb-AF647, kolor niebieski-jądra komórkowe. Preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 800. Strzałki wskazują przykładowe komórki, które pobrały Hb (po lewej stronie pokazane w powiększeniu). Skala przedstawia 20  $\mu$ m.

#### 4.6 Zbadanie ekspresji receptora CD163 w LSEC i KC

Według danych literaturowych wychwyt wolnej hemoglobiny z krwi przebiega poprzez spontaniczne tworzenie się kompleksu Hb-Hp, a następnie przez wychwyt tego kompleksu przez receptor CD163 obecny na makrofagach i monocytach. W celu zbadania znaczenia receptora CD163 w pobieraniu wolnej Hb zmierzono bazalną ekspresję genu *Cd163* w LSEC i KC. Badane populacje zostały wyodrębnione na podstawie barwienia, następnie wysortowane przy użyciu cytometru z funkcją sortera. Z komórek wyizolowano RNA i zmierzono poziom ekspresji *Cd163* za pomocą qPCR. 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.

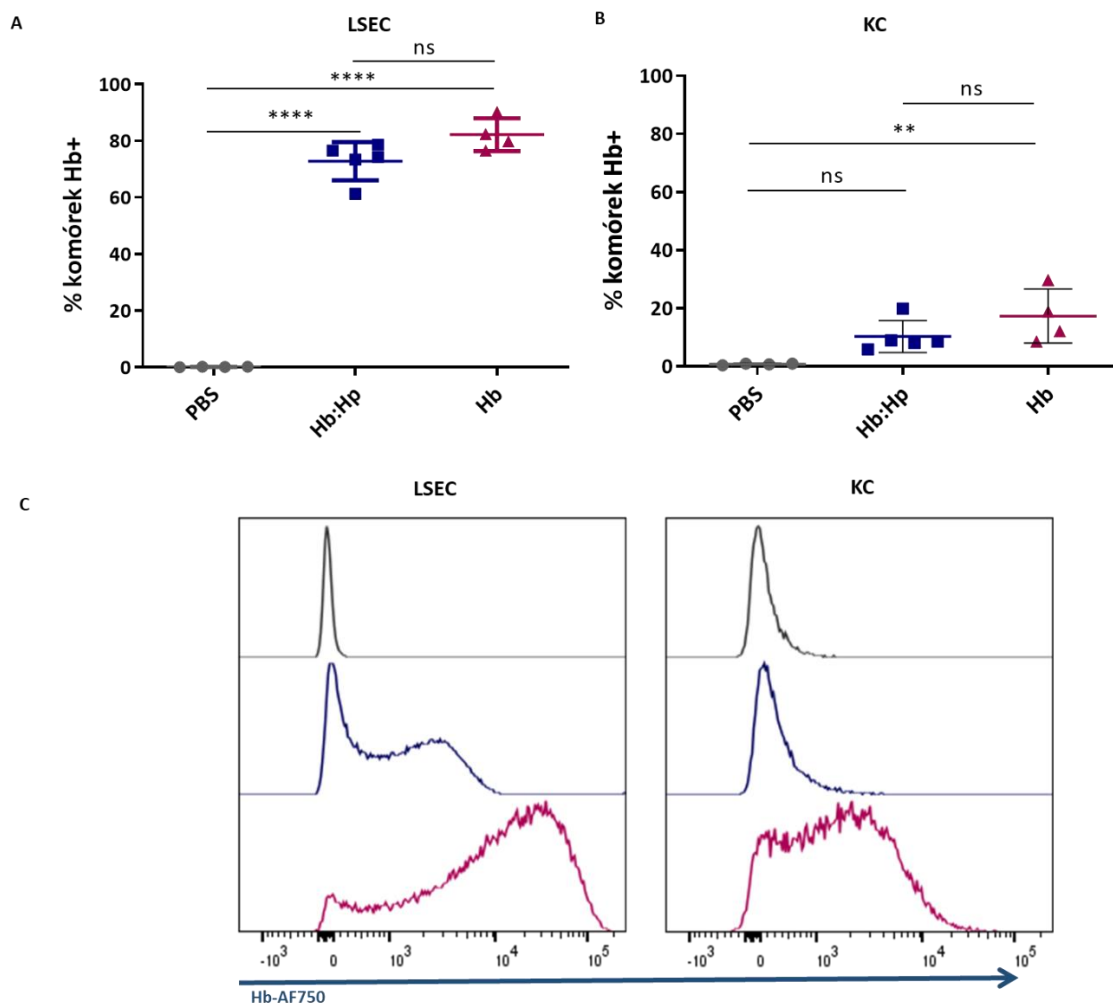


**Rycina 13. Poziom ekspresji genu *Cd163* w komórkach LSEC i KC.** Analizę qPCR wykonano na komórkach LSEC i KC wysortowanych z mysiej wątroby za pomocą cytometru z funkcją sortera. Populacje komórek scharakteryzowano na podstawie markerów powierzchniowych: LSEC (CD45<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>), KC (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>). Wykres przedstawia średnią relatywną ekspresję genu *Cd163* dla LSEC i KC  $\pm$  SD (n=3) \*p<0.1 (test t\_Studenta).

#### 4.7 Zbadanie wpływu obecności Hp na pobieranie Hb przez komórki LSEC i KC

Zgodnie z literaturą, wolna Hb w surowicy jest wychwytywana przez Hp i sekwestrowana przez receptor CD163 obecny na makrofagach. Jednak przedłużone warunki hemolityczne prowadzą do wysycenia tego mechanizmu spadku poziomu Hp. Ponadto fagocytoza uszkodzonych RBC i wychwyt Hb prowadzą do wyczerpania makrofagów odpowiedzialnych za odzyskiwanie żelaza. Co więcej wykazano, że Hb może być również sekwestrowana niezależnie od CD163 lub Hp [56][80]. Nadal jednak nie scharakteryzowano, które mechanizmy są odpowiedzialne za niezależne od makrofagów drogi usuwania wolnej Hb. W kolejnym doświadczeniu zbadano, czy pobieranie Hb przez komórki LSEC i KC jest zależne od obecności Hp. Pobieranie Hb i kompleksu Hb:Hp sprawdzono *in vivo* oraz *in vitro*. Myszom podano dożylnie Hb-AF750 (1 µg/mysz) lub kompleks Hb-AF750:Hp uprzednio skompleksowany w stosunku molowym 1:4 (1 µg Hb /mysz) (jak opisano w podrozdziale 3.4), następnie wybrane populacje komórek wątroby (LSEC i KC) analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Analiza ta wykazała znaczący wychwyt Hb przez LSEC w porównaniu do kontroli, zarówno dla kompleksu Hb:Hp jak i Hb (Ryc. 14A). W przypadku KC również zaobserwowano akumulację kompleksu Hb:Hp i Hb, ale w mniejszym stopniu niż dla LSEC (Ryc. 14B). Nie zaobserwowano znaczącej różnicy w wychwycie pomiędzy kompleksem Hb:Hp i Hb w obydwóch rodzajach komórek, co wskazuje na brak zależności pobierania Hb od jej skompleksowania z Hp.

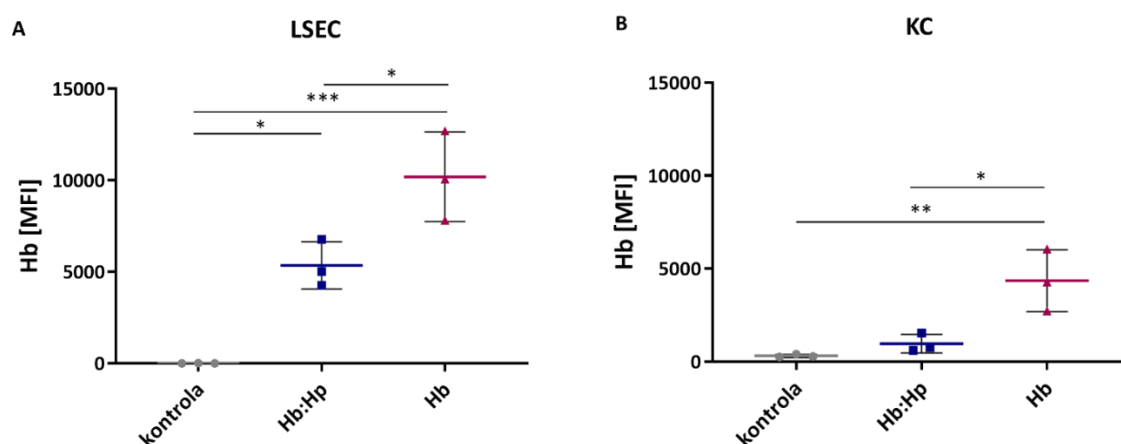




**Rycina 14. Porównanie pobierania Hb i kompleksu Hb:Hp przez komórki LSEC i KC *in vivo*.** Hb lub kompleks Hb:Hp podano myszom dożylnie. Po 1 godzinie wątroby wątroby wypreparowano, perfundowano, barwiono i komórki poddano analizie metodą cytometrii przepływowej. Komórki zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-CD11b, anti-F4/80, anti-CD31, anti-CD146 i anti-Stab2. Rycina przedstawia procent komórek **A.** LSEC i **B.** KC pozytywnych na Hb po podaniu Hb-AF750 i kompleksu Hb:Hp oraz **C.** reprezentatywne histogramy dla LSEC i KC. ns-zmiana nieistotna statystycznie \*\* $p < 0.01$  \*\*\*\* $p < 0.0001$  (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

Eksperyment *in vitro* przeprowadzono w hodowli komórek pierwotnych wątroby. Hodowle pierwotne komórek wątroby prowadzone były jak opisano w podrozdziale 3.8. Komórki inkubowano z Hb-AF750 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) lub Hb-AF750:Hp (1  $\mu\text{g}$  Hb /ml) przez 1 godzinę. Analiza cytometryczna komórek, wykazała bardziej efektywny wychwyt wolnej Hb niż kompleksu Hb:Hp, zarówno przez LSEC (Ryc. 15A) jak i KC (Ryc. 15B). Różnica pomiędzy akumulacją kompleksu Hb:Hp a Hb jest znacząca dla obydwóch typów komórek.

Powyższe wyniki sugerują, że pobieranie Hb *ex vivo* przez komórki LSEC i KC nie jest wzmagane przez Hp, a może być nawet hamowane przez jej obecność.

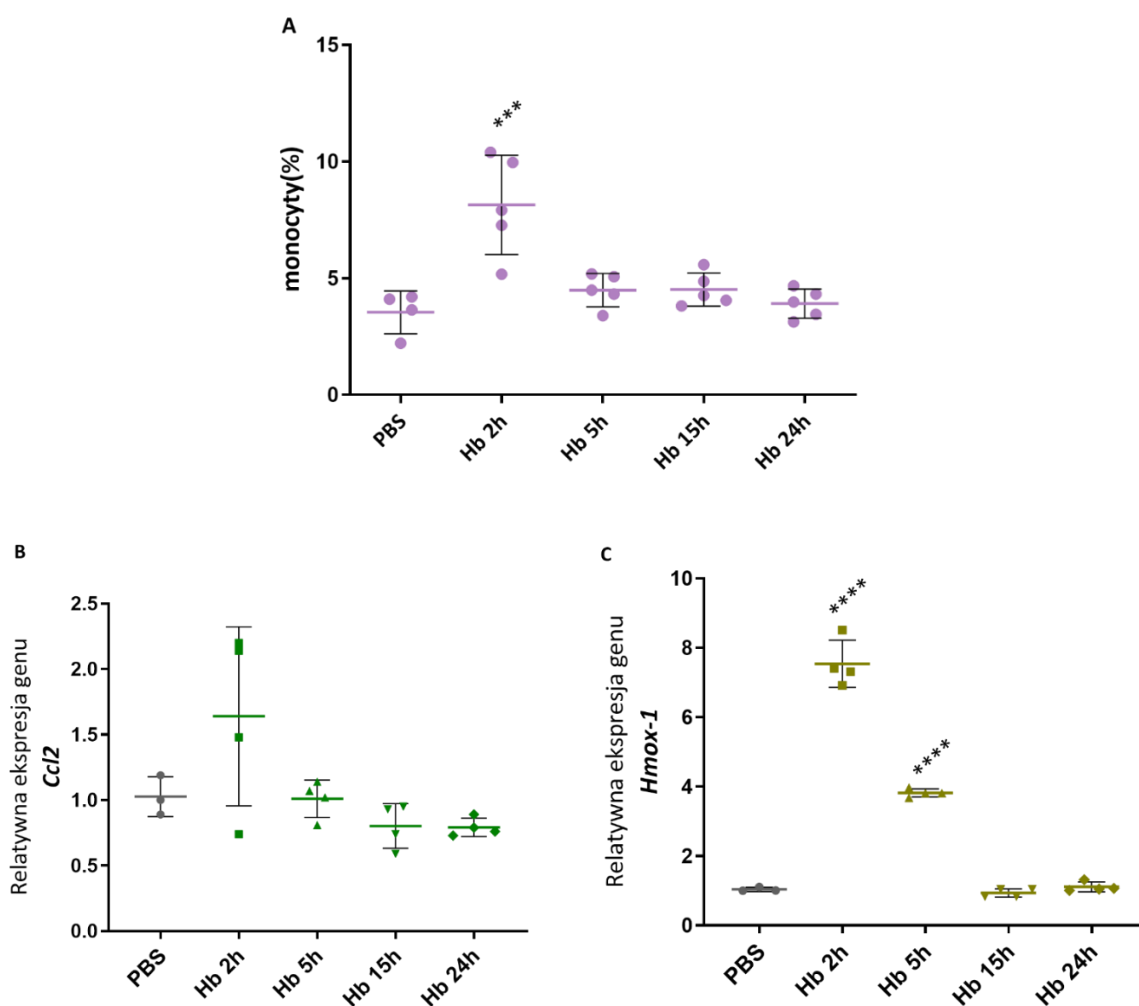


**Rycina 15. Porównanie pobierania Hb i kompleksu Hb:Hp przez komórki LSEC i KC *in vitro*.** Komórki pierwotne wątroby inkubowano w roztworze Hb lub Hb:Hp przez 1 godzinę, następnie zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-F4/80, anti-CD146 oraz anti-Stab2 i analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Rycina przedstawia średnią fluorescencję Hb-AF750 (MFI) w A. LSEC i B. KC ± SD (n=3) \*p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\*<0.001 (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

#### 4.8 Zbadanie efektu wolnej Hb na homeostazę wątroby

W kolejnym etapie określono z jaką kinetyką zachodzą zmiany fizjologiczne w wątrobie po podaniu Hb. W tym celu zbadano efekt wolnej Hb na poziom ekspresji genów *Hmox-1* i *Ccl2* oraz infiltrację monocytów w wątrobie w różnych punktach czasowych: po 2, 5, 15 i 24 godzinach po podaniu Hb. Mysiom podano dożylnie 10 mg Hb- dawkę odpowiadającą ilości Hb wydzielonej podczas hemolizy z erytrocytów zawartych w 100  $\mu$ l krwi, myszy kontrolne otrzymały PBS, w odpowiednich punktach czasowych myszy uśmiercono i wypreparowano wątroby. Prawy tylny płat wątroby zamrożono w  $-20^{\circ}\text{C}$  i poddano procedurze izolacji RNA jak opisano w podrozdziale 3.11. Poziom ekspresji genów mierzono za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). Pozostałe płaty wątroby perfundowano i wyizolowane komórki poddano analizie za pomocą cytometrii przepływowej. Analiza cytometryczna wykazała wzmożoną rekrutację monocytów w wątrobie po 2-godzinnej dystrybucji Hb, natomiast w kolejnych punktach czasowych zaobserwowano spadek odsetku monocytów w wątrobie (Ryc. 16A).

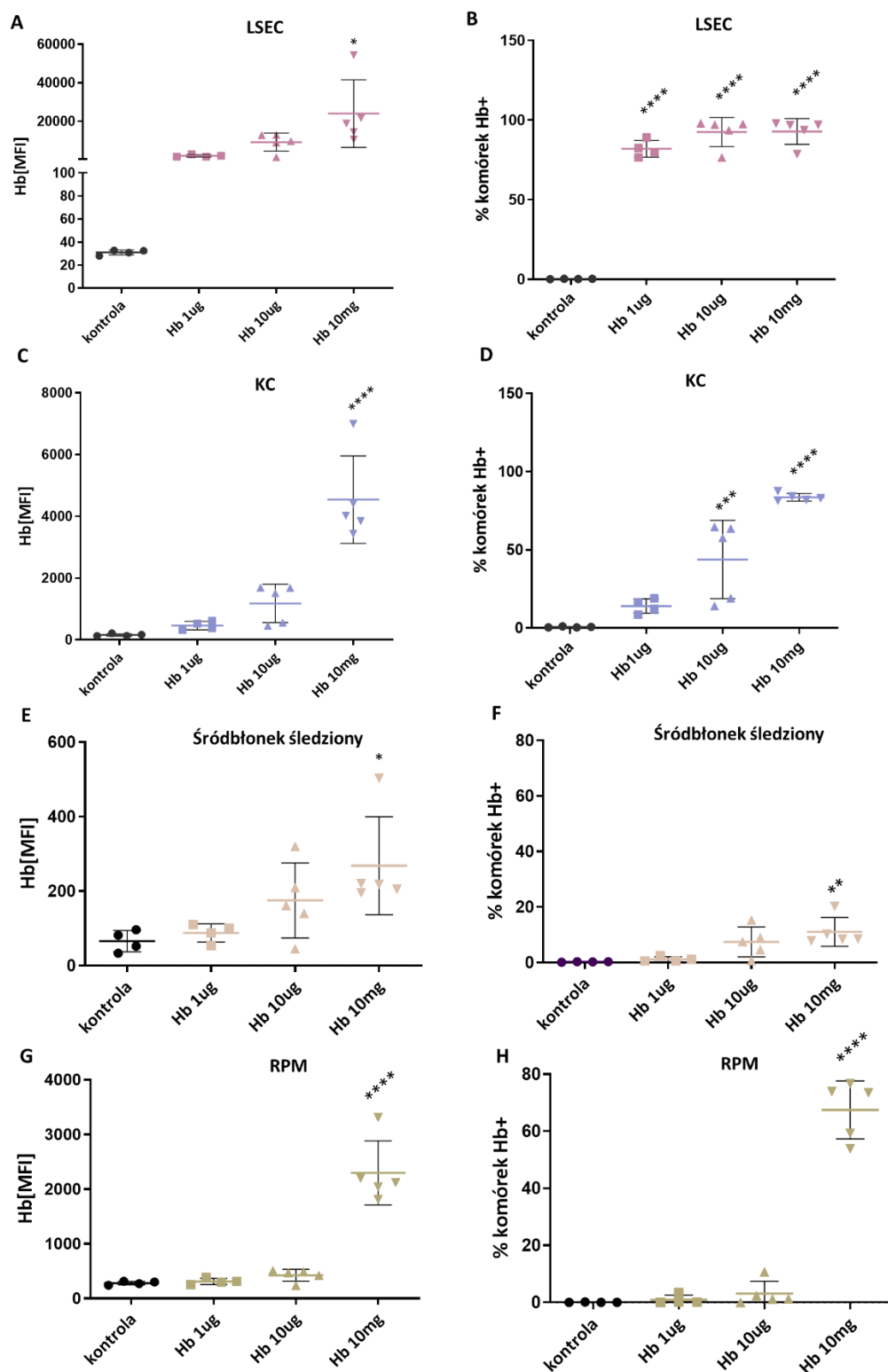
Podobną tendencję zaobserwowano w zmianie ekspresji genów *Hmox-1* i *Ccl2*, jednak dla *Ccl2* nie była ona istotnie różna od kontroli. Poziom ekspresji najbardziej wzrósł po 2- godzinnej dystrybucji Hb i z czasem następował jego spadek zarówno w przypadku *Ccl2* (Ryc. 16B) jak i *Hmox-1* (Ryc. 16C). Przejściowo podwyższony odsetek monocytów i zwiększona ekspresja *Ccl2* może sugerować przejściowy stan zapalny w wątrobie podanej ekspozycji przez wolną Hb. Wychwył Hb w wątrobie wpłynął także na indukcję transkrypcji enzymu katabolizującego hem- *Hmox-1*, co stanowi potwierdzenie uruchomienia w komórkach procesów przetwarzania Hb.



**Rycina 16. Kinetyka zmian w homeostazie wątroby w odpowiedzi na podanie wolnej Hb.** Mysiom podano dożylnie 10 mg Hb lub PBS. Po 2, 5, 15 i 24 godzinach, myszy uśmiercono, wypreparowane wątroby analizowano za pomocą cytometrii przepływowej (A) oraz qPCR (B, C). **A.** Na wykresie przedstawiono średnią wartość procentową  $\pm$  SD (n=3-4) monocytów w wątrobie w różnych punktach czasowych \*\*\* p<0.001 (1- czynnikowa ANOVA z korektą Dunnetta). Wyniki przedstawiają relatywną ekspresję genów **(B)** *Ccl2* i **(C)** *Hmox-1* w wątrobie względem genu referencyjnego *Rpl19*  $\pm$  SD (n=3-4)\*\*\*\* p<0.0001 (1- czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

#### 4.9 Zbadanie efektywności pobierania Hb przez komórki śródbłonka i makrofagi w wątrobie i śledzionie w zależności od dawki

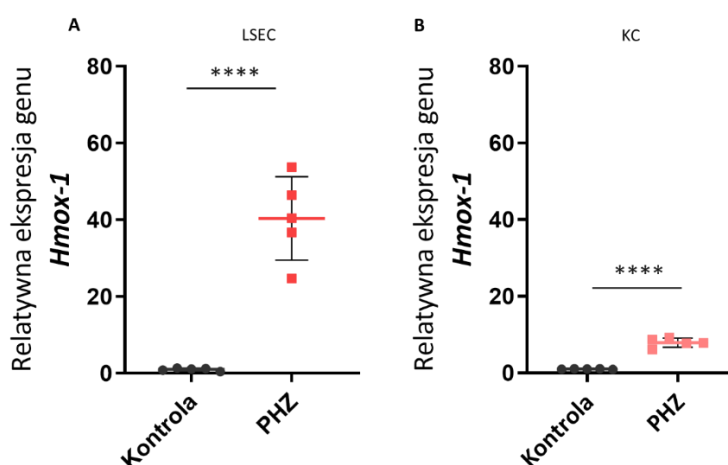
Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie czy wychwyt Hb przez LSEC i KC jest zależny od dawki Hb. Dodatkowo sprawdzono efektywność wychwytu Hb przez sinusoidalne komórki śródbłonka i RPM w śledzionie. Mysiom podano dożylnie Hb- AF750 w 3 różnych dawkach: 1  $\mu\text{g}/\text{mysz}$ -czyli dawkę poniżej zdolności wiązania do Hp, dawkę pośrednią 10  $\mu\text{g}/\text{mysz}$  i 10  $\text{mg}/\text{mysz}$  (w tym 100  $\mu\text{g}$  Hb było wyznakowane AF750)- dawkę która odpowiada ilości Hb wydzielonej podczas hemolizy z erytrocytów zawartych w 100  $\mu\text{l}$  krwi. Myszy kontrolne otrzymały PBS. Po 1 godzinie myszy uśmiercono, wątroby i śledziona wypreparowano i poddano obróbce w celu uzyskania zawiesiny komórkowej, następnie zabarwiono i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. W wątrobie pobieranie Hb porównano pomiędzy komórkami LSEC ( $\text{CD45}^+\text{CD31}^+\text{CD146}^+\text{Stab2}^+$ ) i KC ( $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+$ ). W śledzionie wychwyt Hb analizowano w populacji komórek śródbłonka ( $\text{CD45}^-\text{CD31}^+$ ) i RPM ( $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+$ ). Komórki LSEC osiągnęły wysoką wartość średniej fluorescencji (MFI) dla Hb-AF750 (ryc 12a) we wszystkich trzech analizowanych stężeniach Hb. Analiza wykazała także, że w przypadku LSEC, odsetek komórek pobierających Hb, nie jest zależny od dawki Hb (Ryc. 17B), natomiast akumulacja Hb przez KC rosła wraz ze wzrostem dawki wolnej Hb (Ryc. 17D). Jednakże KC nigdy nie osiągnęły średniej fluorescencji na poziomie zbliżonym do LSEC (Ryc. 17A i C). W przypadku komórek śródbłonka śledziona, wychwyt Hb stopniowo wzrastał wraz z podaną dawką (Ryc. 17 E i F), jednakże ten wzrost osiągał jedynie znikome wartości w porównaniu do KC, a zwłaszcza w porównaniu do LSEC. RPM brały udział w wychwycie Hb tylko przy podaniu największej dawki (Ryc. 17 G i H). Wyniki sugerują, że w porównaniu z innymi komórkami, LSEC są najbardziej wydajne w pobieraniu Hb w niższym zakresie stężeń, a kiedy pojawia się więcej Hb, np. podczas hemolizy, to w proces ten angażują się także KC, RPM oraz komórki śródbłonka śledziona.



**Rycina 17. Efektywność pobierania Hb przez komórki śródbłonna i makrofagi w wątrobie i śledzionie, w odniesieniu do podanej dawki.** Myszy otrzymały dożylnie Hb-AF750 w dawkach: 1 µg/mysz, 10 µg/mysz i 10 mg/mysz. Po 1 godzinie z organów wyizolowano komórki i poddano analizie cytometrycznej. Pobieranie Hb zbadano w LSEC (CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>), KC (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), komórkach śródbłonna śledziony (CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) i RPM (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). Na wykresach przedstawiono średnią wartość fluorescencji dla Hb ± SD (n=4-5) w **A.** LSEC **C.** KC **E.** komórkach śródbłonna śledziony i **G.** RPM oraz średnią wartość procentową ± SD (n=4-5) komórek pozytywnych na Hb: **B.** LSEC **D.** KC **F.** komórkach śródbłonna śledziony i **H.** RPM \*\*\* <0.001 \*\*\*\* p<0.0001 (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

#### 4.10 Porównanie działania endogennej i egzogennej Hb na profil ekspresji genu *Hmox-1* w komórkach LSEC i KC

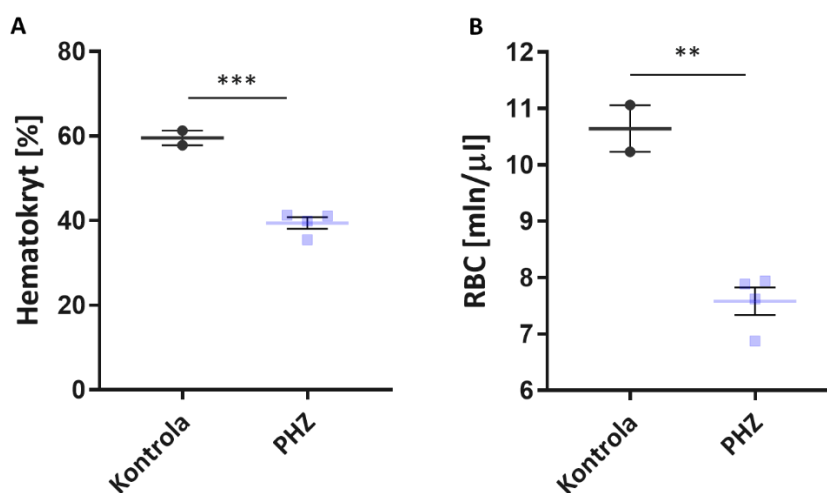
W kolejnym doświadczeniu zweryfikowano czy indukowana liza erytrocytów *in vivo* powoduje takie same zmiany ekspresji genu *Hmox-1* w komórkach wątroby jak podanie wolnej Hb. Działanie egzogennej Hb (izolowanej z krwi dawców) porównano z Hb endogenną, wydzielaną z lizujących *in vivo* erytrocytów. W tym celu wykorzystano klasyczny model niedokrwistości hemolitycznej, w którym uwalnianie Hb z erytrocytów jest indukowane poprzez podanie fenylhydrazyny (ang. *phenylhydrazine*; PHZ). Myszom podano dootrzewnowo PHZ (125  $\mu\text{g/g}$  masy ciała), myszy kontrolne otrzymały PBS. Po 6 godzinach myszy uśmiercono, wątroby wycięto, perfundowano i poddano obróbce w celu wysortowania komórek LSEC i KC. Następnie z komórek wyizolowano RNA i poddano analizie. Ekspresję genu *Hmox-1* analizowano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. Zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji genu *Hmox-1* zarówno w LSEC (Ryc. 18A) jak i w KC (Ryc. 18B) w porównaniu do kontroli, podobnie jak w przypadku egzogennej Hb, której podanie spowodowało wzrost ekspresji *Hmox1* w wątrobie (Ryc. 16C).



**Rycina 18. Poziom ekspresji genu *Hmox-1* po chemicznej indukcji niedokrwistości przy użyciu PHZ.** Myszom podano dootrzewnowo PHZ (125  $\mu\text{g/g}$  masy ciała), myszy kontrolne otrzymały PBS. Po 6 godzinach myszy uśmiercono, wątroby wycięto i wysortowano z nich LSEC oraz KC. Ekspresję *Hmox-1* analizowano za pomocą qPCR. Na wykresach przedstawiono średnią relatywną ekspresję genu *Hmox-1*  $\pm$  SD (n=5) w A. LSEC i w B. KC. \*\*\*\* $p < 0.0001$  (test t-Studenta).

Aby potwierdzić skuteczność działania PHZ, myszom pobrano krew i zbadano stosunek objętościowy erytrocytów do krwi pełnej (hematokryt) oraz ilość erytrocytów (RBC) we krwi. Analiza wykazała spadek poziomu hematokrytu o 20% (Ryc. 19A), a także

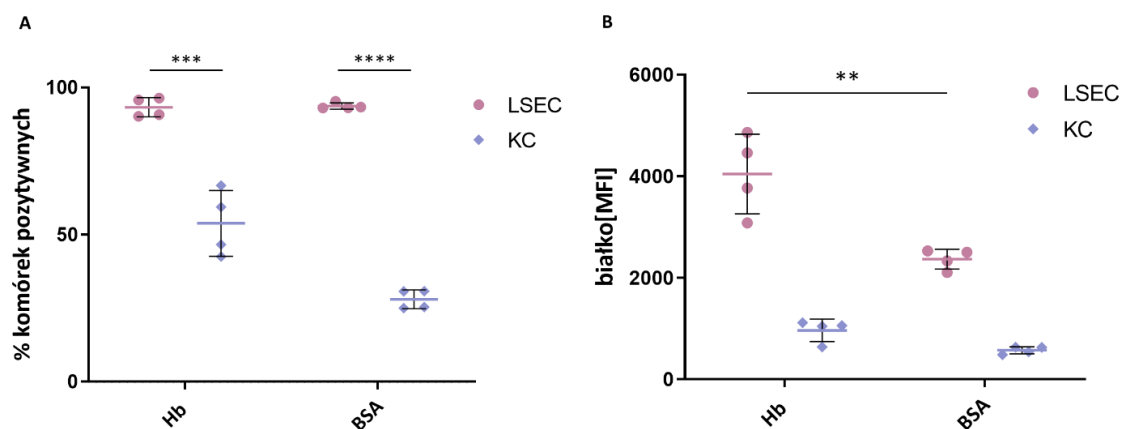
zmniejszoną zawartość erytrocytów we krwi u myszy (Ryc. 19B), którym podano PHZ w porównaniu z kontrolą, co potwierdziło efektywną indukcję hemolizy przez PHZ.



**Rycina 19. Indukcja lizy erytrocytów po podaniu PHZ.** Mysiom podano dootrzewnowo PHZ (125  $\mu\text{g/g}$  masy ciała), myszy kontrolne otrzymały PBS. Po 6 godzinach pobrano krew i zmierzono w niej poziom hematokrytu oraz zawartość RBC. Wykresy przedstawiają: **(A)** średni poziom hematokrytu  $\pm$  SD i **(B)** średnią ilość RBC na 1  $\mu\text{l}$  krwi  $\pm$  SD (n=2-4) (B) (n=2-4) \*\*p<0.1\*\*\*p<0.001 (test t-Studenta).

#### 4.11 Specyficzność wychwytu Hb przez LSEC

Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie czy wychwyt Hb przez LSEC jest charakterystyczny tylko dla Hb. Akumulację Hb porównano z innym białkiem- albuminą surowicy bydłowej (BSA). Koniugaty Hb-AF750 i BSA-AF750 (10 µg/mysz) podano myszom dożylnie. Po upływie 1 godziny myszy uśmiercano, wątroby wycinano, perfundowano i komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej. Akumulację białek mierzono w 2 populacjach komórek: LSEC (CD45<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>Stab2<sup>+</sup>) i KC (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). Komórki LSEC efektywnie pobrały zarówno Hb jak i BSA, w odsetku zbliżonym do 95% (Ryc. 20A), jednak średnia fluorescencja LSEC jest znacząco wyższa dla Hb niż dla BSA, co wskazuje na wyższą wydajność pobierania Hb w porównaniu do BSA (Ryc. 20B). W przypadku KC, podobnie jak we wcześniejszych wynikach, około 50% komórek pobrało Hb, natomiast tylko 30% komórek pobrało BSA. Średnia fluorescencja KC zarówno dla Hb jak i BSA jest około czterokrotnie niższa niż komórek LSEC, co sugeruje, że wychwyt białek jest wydajniejszy w wykonaniu LSEC.



**Rycina 20. Wychwyt Hb i BSA przez komórki LSEC i KC.** Mysiom wstrzykiwano dożylnie 10 µg Hb lub BSA skoniugowanych z AF750. Po upływie 1 godziny wątroby wycięto, perfundowano i poddano analizie metodą cytometrii przepływowej. Komórki zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-F4/80, anti-CD146 i anti-Stab2. Wykresy przedstawiają: **(A)** odsetek komórek LSEC i KC, które pobrały Hb lub BSA oraz **(B)** średnią fluorescencję (MFI) dla białek-Hb i BSA. Wyniki przedstawione są jako średnia ± SD (n=4). \*\*p<0.1\*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (test t- Studenta).

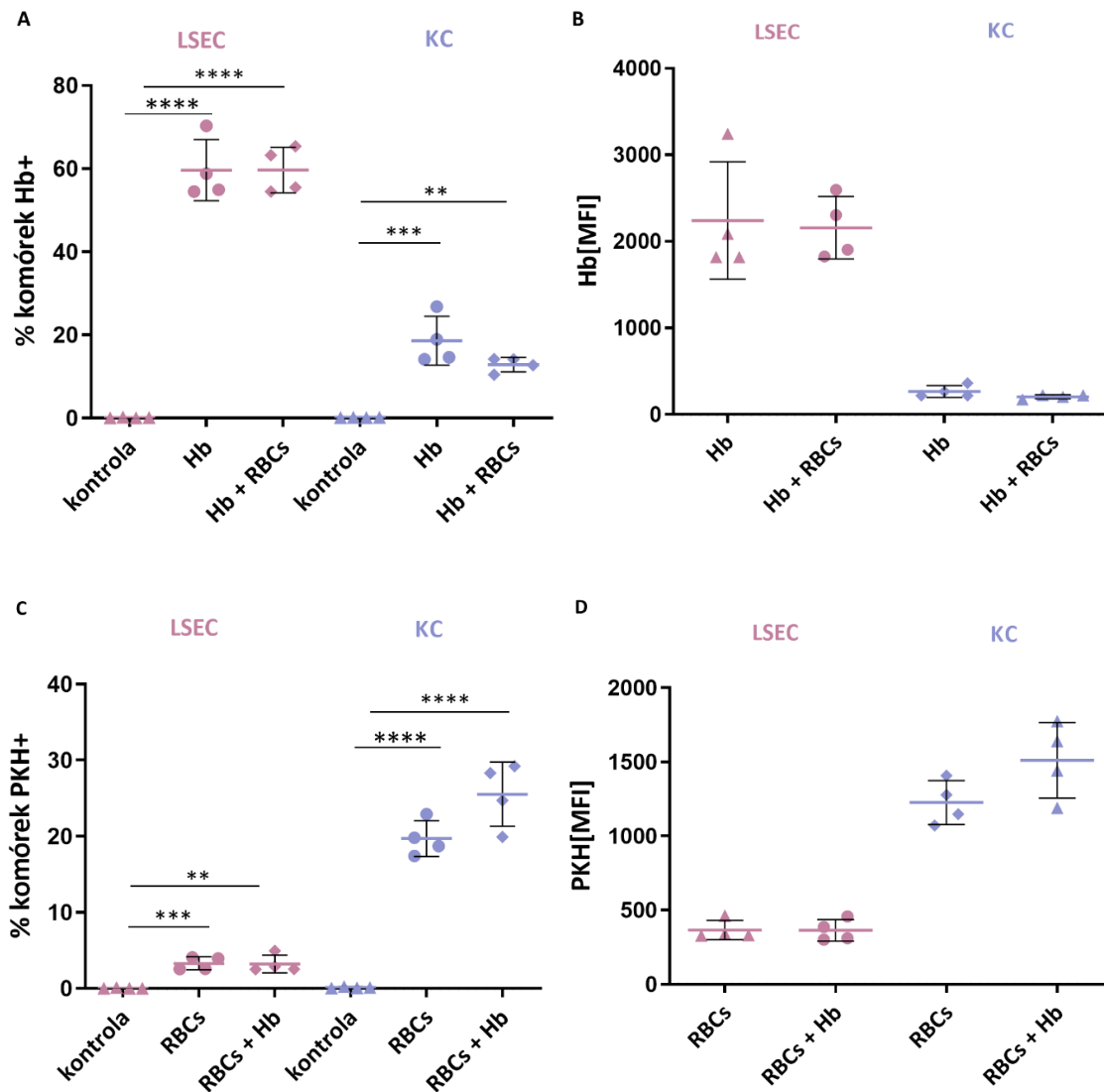


#### 4.12 Porównanie wychwytu Hb i RBC poddanych stresowi cieplnemu

Obecność uszkodzonych czerwonych krwinek jest charakterystyczna dla nabytych i genetycznych chorób hemolitycznych, takich jak hemoliza polekowa czy anemia sierpowata. W takich warunkach we krwi pojawiają się zarówno zniszczone krwinki czerwone, jak i wolna hemoglobina. W kolejnym doświadczeniu sprawdzono jakie są różnice w wychwytcie uszkodzonych RBC (poddanych stresowi cieplnemu) i wolnej Hb. Myszom podano dożylnie- osobno lub jednocześnie, Hb-AF750 (10 µg/mysz) i erytrocyty poddane stresowi cieplnemu, uprzednio zabarwione PKH-67 (RBC-PKH). Zestawienie grup doświadczalnych przedstawiono w Tabeli 3. Po 1 godzinie myszy uśmiercono, wypreparowane wątroby perfundowano i komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej. Porównano wychwyt Hb i RBC pomiędzy LSEC i KC. Średnio 60% LSEC pobrało wolną Hb jak i Hb podaną razem z RBC, w przypadku KC było to 15-20% (Ryc. 21A). Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, zaobserwowano także wyższą średnią fluorescencję (MFI) dla Hb w LSEC w porównaniu do KC (Ryc. 21B). W przypadku RBC-PKH, bardziej wydajna akumulacja nastąpiła w KC: średnio 20% KC pobrało same RBC, a średnio 25% RBC podane z Hb (Ryc. 21C). Również średnia fluorescencja (MFI) dla RBC-PKH była wyższa w KC niż w LSEC (Ryc. 21D). Analiza wykazała wyraźne różnice w funkcjach komórek LSEC i KC, gdzie zgodnie z danymi literaturowymi [81], KC pochłaniają erytrocyty poddane stresowi cieplnemu, podczas gdy LSEC pochłaniają wolną Hb.

**Tabela 3.** Zestawienie grup doświadczalnych.

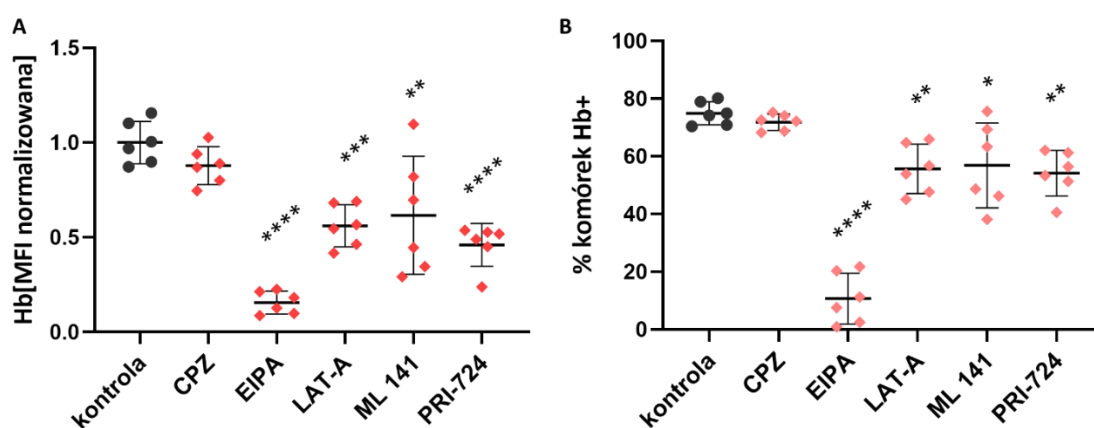
Grupa	PBS	Hb-AF750 (10 µg)	RBC-PKH
1	✓		
2		✓	
3			✓
4		✓	✓



**Rycina 21. Wychwyt Hb i zniszczonych erytrocytów przez komórki LSEC i KC.** Mysiom wstrzykiwano dożylnie Hb-AF750 lub/i erytrocyty poddane szokowi cieplnemu (RBCs) zabarwione PKH. Po 1 godzinie myszy uśmiercono, wątroby wypreparowano a komórki poddano analizie cytometrycznej. Komórki zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-F4/80, anti-CD146 i anti-Stab2. Wyniki przedstawiono jako średni odsetek komórek pozytywnych na **A.** Hb i **C.** PKH w odniesieniu do kontroli (PBS) oraz średnią fluorescencję dla **B.** Hb i **D.** PKH  $\pm$  SD (n=4) \*\*p<0.1\*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

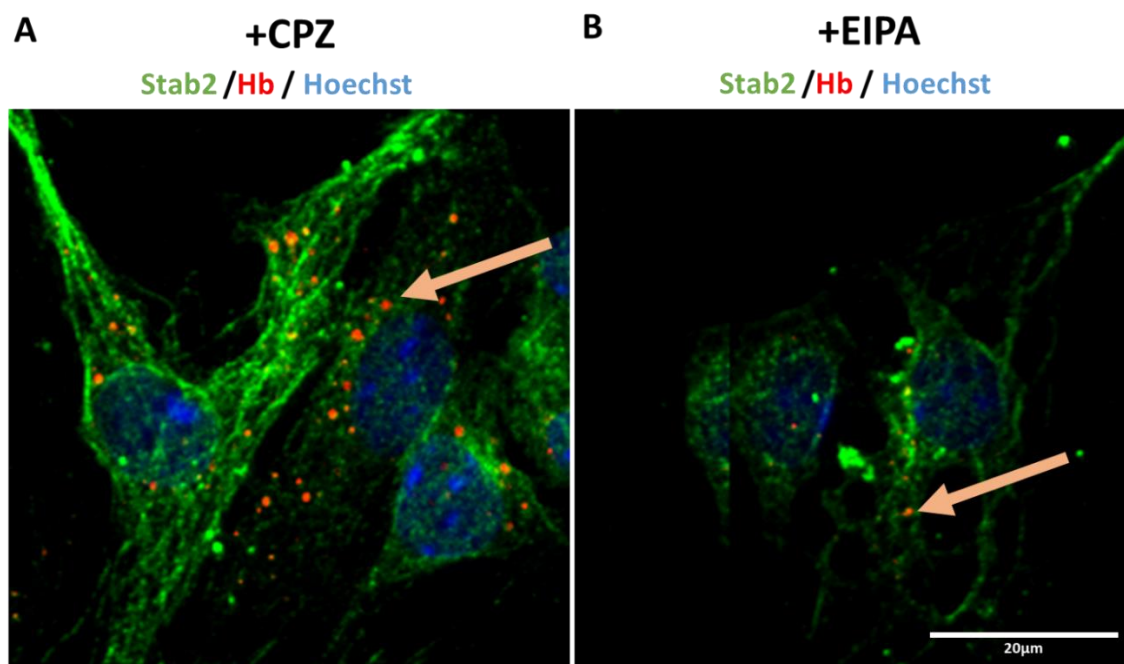
#### 4.13 Zbadanie pobierania Hb przez LSEC za pomocą makropinocytozy

W kolejnym etapie zbadano udział procesu makropinocytozy w pobieraniu Hb przez komórki LSEC. W tym celu nieparenchymalne komórki pierwotne wątroby inkubowano z inhibitorami: endocytozy klatrynozależnej (Chloropromazine, CPZ), makropinocytozy (EIPA), polimeryzacji aktyny (Latrunculin-A, LAT-A), GTPazy Cdc42 (ML 141) i  $\beta$ -kateniny (PRI-724). Po inkubacji z inhibitorami, do komórek dodawano Hb-AF-750. Następnie, pobieranie Hb przez komórki nieparenchymalne oceniano za pomocą cytometrii przepływowej w populacji LSEC ( $CD45^{\dim}CD31^{hi}Stab2^{hi}CD146^{hi}$ ). Zaobserwowano zdecydowanie mniejszy wychwyt Hb w komórkach, w których zablokowano makropinocytozę (inhibitor EIPA), niż w przypadku komórek, w których zablokowano endocytozę klatrynozależną (inhibitor CPZ) (Ryc. 22A i B). Inhibicja polimeryzacji aktyny (Latrunculin-A, LAT-A) oraz zahamowanie GTPazy Cdc42 (ML 141) miało istotny efekt na zahamowanie pobierania Hb, jednak był on mniejszy niż w przypadku zahamowania makropinocytozy. Dodatkowo wykazano, że internalizacja Hb była częściowo zależna od przebudowy aktyny, procesu niezbędnego dla formowania się makropinosomów oraz kanonicznej ścieżki Wnt, która bierze udział w aktywacji makropinocytozy (Ryc. 22A i B).



**Rycina 22. Wpływ inhibitorów endocytozy i makropinocytozy na pobieranie Hb zbadany za pomocą cytometrii przepływowej.** Komórki nieparenchymalne inkubowano z inhibitorami endocytozy (CPZ), makropinocytozy (EIPA), polimeryzacji aktyny (LAT-A), GTPazy Cdc42 (ML 141) i  $\beta$ -kateniny (PRI-724), następnie do komórek dodawano Hb-AF647. Po inkubacji z Hb, komórki zabarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-CD31, anti-Stab2, anti-CD146 i poddano analizie za pomocą cytometrii przepływowej. **A.** Na wykresach przedstawiono średnią fluorescencję  $\pm$  SD Hb (MFI) w LSEC i **B.** średnią wartość procentową  $\pm$  SD komórek pozytywnych na Hb. (n=6) \* $<0.1$  \*\* $<0.01$  \*\*\* $<0.001$  \*\*\*\* $<0.0001$  (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

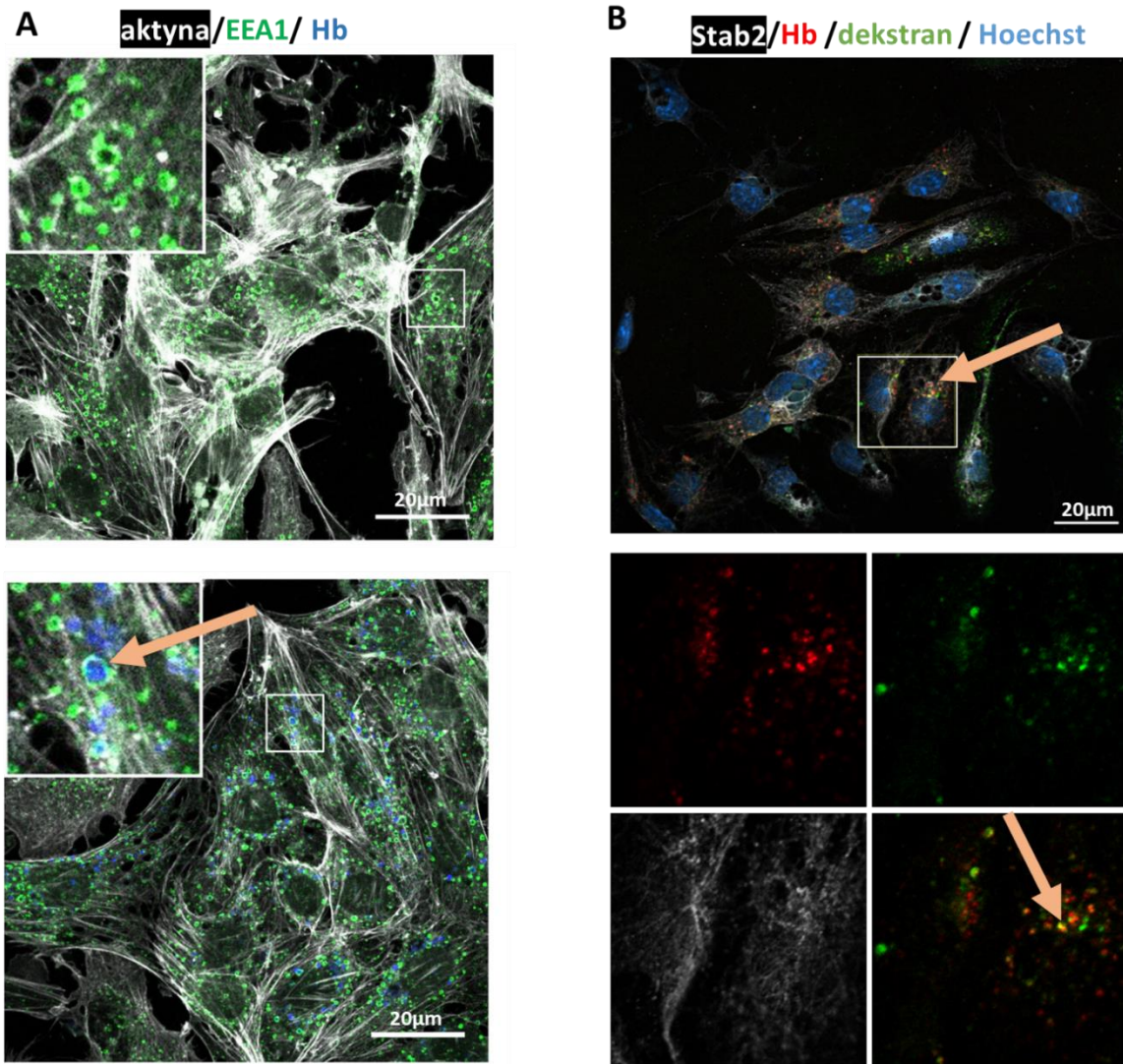
Wychwyt Hb w komórkach pierwotnych inkubowanych z inhibitorami makropinocytozy (EIPA) i endocytozy klatrynozależnej (CPZ) obrazowano także z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. W LSEC (kolor zielony) inkubowanych z CPZ (Ryc. 23A) zaobserwowano więcej sygnału pochodzącego od Hb (kolor czerwony) niż w przypadku LSEC (kolor zielony) inkubowanych z EIPA (Ryc. 23B), co sugeruje, że w przypadku kiedy proces makropinocytozy jest zahamowany, LSEC nie mogą efektywnie pobrać Hb.



**Rycina 23. Wpływ inhibitora makropinocytozy na pobieranie Hb z obrazowaniem za pomocą mikroskopii konfokalnej.** Komórki nieparenchymalne inkubowano z inhibitorem endocytozy (CPZ) (A) lub inhibitorem makropinocytozy (EIPA) (B), następnie do komórek dodawano Hb-AF647 (kolor czerwony). Komórki utrwalano i barwiono przeciwciałem anti-STAB2 (kolor zielony) oraz barwnikiem Hoechst (kolor niebieski) i obrazowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Skala przedstawia 20  $\mu\text{m}$ .

W kolejnym doświadczeniu zbadano, czy po pobraniu Hb w LSEC obecne są pęcherzyki makropinocytarne - makropinosomy. W tym celu wykonano dwa eksperymenty z pierwotnymi LSEC, dodatkowo oczyszczonymi z KC za pomocą kulek magnetycznych opłaszczonych anti-F4/80. W pierwszym eksperymencie, wątrobowe komórki pierwotne, pozbawione KC, inkubowane były z Hb-AF647 przez 1 h. Następnie komórki utrwalano i zabarwiono przeciwciałem anti-EEA1 (ang. Early Endosome Antigen 1), które wyznacza wczesne endosomy. W drugim eksperymencie, po inkubacji komórek z Hb-AF647, komórkom podano marker fazy płynnej makropinosomów- dekstran. Następnie komórki

utrwalono i zabarwiono przeciwciałem anty-Stab2, wszystkie preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Barwienie LSEC markerem wczesnych endosomów, wykazało obecność wielu wewnątrzkomórkowych pęcherzyków o rozmiarze odpowiadającym makropinosomom (1-2  $\mu\text{m}$ ) (Ryc. 24A kolor zielony). Zaobserwowano, że Hb-AF647 była zamknięta w takich pęcherzykach, chociaż niewyłącznie (Ryc. 24A kolor niebieski). Wyniki wykazały także kolokalizację Hb-AF647 (kolor czerwony) z dekstranem (kolor zielony) (Ryc. 24B). Powyższe wyniki sugerują, że LSEC mogą wykorzystywać makropinocytozę, jako mechanizm wychwytu wolnej Hb.



**Rycina 24. Pobieranie Hb za pomocą makropinocytozy.** **A.** lokalizacja Hb-AF647 w pęcherzykach została zobrazowana w pierwotnych komórkach nieparenchymalnych oczyszczonych z KC. Strzałka wskazuje sygnał Hb-AF647 (kolor niebieski) zlokalizowany w pęcherzyku zabarwionym EEA1 (kolor zielony) i aktyną (kolor biały). **B.** kolokalizację Hb-AF746 i dekstranu zobrazowano w komórkach LSEC zabarwionych przeciwciałem anti-Stab2 (kolor biały). Strzałki wskazują nachodzące na siebie sygnały Hb-AF647 (kolor czerwony) i dekstranu (kolor zielony) przedstawione na zdjęciu z nałożonymi kanałami (powyżej) i na rozdzielonych kanałach (poniżej). Skala przedstawia 20  $\mu\text{m}$ .

## 5. Dyskusja

W warunkach fizjologicznych hemoliza zachodzi w niewielkim stopniu w śledzionie, powodując ciągłe uwalnianie niewielkich ilości pozakomórkowej Hb do krążenia wrotnego. Natomiast w warunkach patofizjologicznych, takich jak anemie dziedziczne i infekcje hemoliza może mieć znacznie większą intensywność, uwalniając wyższe stężenia wolnej Hb. Produkty pochodzące z hemolizy mogą być szybko neutralizowane przez liczne systemy obronne, w tym białka osoczowe Hp i Hx, które wychwytyują odpowiednio hemoglobinę i hem. Mechanizmy te zapobiegają szkodliwemu działaniu wolnej Hb, która ma zdolności prooksydacyjne i prozapalne, co może prowadzić do uszkodzenia tkanek. Rolę w detoksykacji Hb przypisuje się makrofagom, które są odpowiedzialne za sekwestrację kompleksów Hb-Hp za pomocą receptora CD163 [82]. Jednakże to niejedyny mechanizm odpowiedzialny za wychwyt wolnej Hb.

Komórki śródbłonka zatok wątroby (LSEC) są najliczniejszą populacją nieparenchymalnych komórek wątroby. LSEC nie tworzą zwykłej bariery w obrębie naczyń zatokowych, ale pełnią ważne funkcje fizjologiczne i immunologiczne, w tym odpowiadają za filtrację, endocytozę, prezentację antygenów i rekrutację leukocytów [22]. Ponadto LSEC inicjują i podtrzymują mechanizmy regeneracji wątroby poprzez wydzielanie czynników wzrostu HGF i Wnt2 [83]. W warunkach fizjologicznych LSEC regulują napięcie naczyń wątrobowych, przyczyniając się do utrzymania niskiego ciśnienia wrotnego pomimo znacznych zmian w przepływie krwi przez wątrobę zachodzących podczas trawienia. LSEC utrzymują w uśpieniu komórki gwiaździste wątroby, zapobiegając zwężaniu się naczyń krwionośnych i procesowi zwłóknienia [21]. Zdolność LSEC do wychwytywania makrocząsteczek takich jak zdenaturowany kolagen, lipopolisacharydy, wirusy, kompleksy immunologiczne i LDL jest niezbędna do utrzymania homeostazy w wątrobie. Biorąc pod uwagę te wielofunkcyjne właściwości, LSEC wykazują unikalne cechy strukturalne i fenotypowe, które odróżniają je od śródbłonka naczyń obecnego w innych narządach [13].

W niniejszej pracy zidentyfikowano nową i nieopisaną dotychczas homeostatyczną rolę LSEC, mianowicie pokazano, że są one główną populacją komórek odpowiedzialną za wychwyt wolnej Hb, którą pobierają poprzez makropinocytozę. Mechanizm wychwytu Hb przebiega odmiennie do tego występującego w makrofagach

i jest on niezależny od Hp czy receptora CD163. Ponadto wykazano, że LSEC biorą udział w metabolizmie pobranej Hb i są zdolne do jej degradacji.

### 5.1 Biodystrybucja wolnej Hb w organach

Wolna Hb w surowicy jest sekwestrowana przez Hp i wychwytywana przez receptor CD163 obecny na makrofagach śledzionowych i wątrobowych KC. Jednak przedłużone warunki hemolityczne prowadzą do wysycenia tego mechanizmu i spadku poziomu Hp [54]. Ponadto fagocytoza uszkodzonych RBC i wychwyt Hb prowadzą do wyczerpania puli makrofagów odpowiedzialnych za odzyskiwanie żelaza. Co więcej opisano, że Hb może być również sekwestrowana niezależnie od CD163 lub Hp [56] [80]. Nadal jednak nie scharakteryzowano, które mechanizmy są odpowiedzialne za niezależne od makrofagów drogi usuwania wolnej Hb. W pierwszej części niniejszej pracy zbadano wpływ usunięcia makrofagów tkankowych, za pomocą liposomów zawierających kwas kłodronowy, na pobieranie wolnej Hb przez wątrobę, śledzionę, nerki i płuca. Za pomocą bioobrazowania organów, zaobserwowano, że wątroba zaabsorbowała Hb z największą wydajnością niezależnie od obecności makrofagów (Ryc. 6), co potwierdza obserwacje z naszej poprzedniej pracy opisane w Kiraga i wsp. 2020 [84]. Uzyskane wyniki sugerują, że w wątrobie istnieje inna populacja komórek, która może przejąć rolę wychwyty wolnej Hb w przypadku nieobecności makrofagów. Następnie zbadano biodystrybucję podanej dożylnie wolnej Hb (uprzednio wyznakowanej radioizotopem <sup>131</sup>I) (Ryc. 8). Uzyskane wyniki potwierdziły największą wydajność wątroby w wychwycie Hb w porównaniu do innych organów posiadających naczynia zatokowe. Wyniki powyższych eksperymentów wykazały także efektywny wychwyt Hb w nerkach, co potwierdza doniesienia literaturowe o ekspresji Hp w nerkach, (zwłaszcza w przypadku wysokich dawek wolnej Hb), wskazujące na ich zaangażowanie w przetwarzanie wolnej Hb [55], [85]–[87]. W badaniach przeprowadzonych przez Etzerodt i wsp. zaobserwowano podobną biodystrybucję Hb u myszy dzikich, gdzie Hb skoniugowana z barwnikiem ATTO488 została pobrana z największą wydajnością przez wątrobę i z nieco mniejszą przez nerki [80].



## 5.2 Komórki odpowiedzialne za wychwyt wolnej Hb

Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z organów poddanych bioobrazowaniu wykazała, że liposomalny klodronat skutecznie spowodował deplecję KC, ale nie wpłynął na liczebność dwóch innych dominujących populacji komórek w wątrobie- hepatocytów i LSEC (Ryc. 7). Nie jest to zaskakujący wynik z uwagi na to, że liposomy z kwasem klodronowym są narzędziem stosowanym z sukcesem od lat, do relatywnie precyzyjnego i przejściowego usunięcia komórek fagocytujących. W kolejnym etapie zbadano zdolność różnych populacji komórek wątroby do wychwytu Hb. Zaobserwowano, że tylko dwie populacje komórek pobrały Hb- KC i LSEC, przy czym LSEC były w tym procesie dwa razy bardziej efektywne niż KC, co zostało odzwierciedlone przez wyższy odsetek populacji pozytywny na Hb oraz ich większą fluorescencję (Ryc. 10). Według literatury obecność receptora CD163 na KC, pozwala odróżnić KC od pozostałych komórek wątroby, ale jego niskie poziomy ekspresji opisano także w LSEC [12]. Aby to potwierdzić, zbadano bazalną ekspresję genu *Cd163* w pierwotnych KC i LSEC. Spośród badanych komórek, tylko KC wykazały ekspresję genu *Cd163* (Ryc. 13). Ponadto podanie myszom kompleksu Hb/Hp nie zwiększyło, ale nieznacznie zmniejszyło efektywność wychwytu Hb zarówno w KC jak i w LSEC (Ryc. 14). Podobne wyniki zostały uzyskane w eksperymencie *in vitro*, gdzie zaobserwowano bardziej efektywny wychwyt wolnej Hb niż kompleksu Hb:Hp, zarówno przez LSEC jak i KC (Ryc. 15). Wyniki te świadczą o tym, że pobieranie Hb w znacznym stopniu jest niezależne od Hp i receptora CD163. Powyższe obserwacje potwierdzają dotychczasowe dane, z których wynika, że u myszy wychwyt Hb przez receptor CD163 jest niezależny od formowania się kompleksu Hb/Hp [80]. Etzertdot i wsp. wykazali, że wychwyt Hb u myszy *Cd163<sup>+/+</sup>* i u myszy *Cd163<sup>-/-</sup>* był na takim samym poziomie. Ponadto, inna grupa badaczy zaobserwowała, że brak Hp nie zaburzył pobierania wolnej Hb u myszy *Hp<sup>-/-</sup>* [88]. Według przytoczonych wyżej publikacji, w przeciwieństwie do ludzkiej Hp, mysia Hp nie powoduje bardziej efektywnego wychwytu Hb przez receptor CD163, który prawdopodobnie odpowiada za pobieranie tylko części wolnej Hb [80] [88]. Wcześniejsze badania wykazały także, że wolna mysia Hb pobierana przez zależną od receptora endocytozę, hamuje wychwyt kompleksu Hb/Hp, co może świadczyć o ich wspólnym miejscu wiązania do receptora CD163 [56]. Obecnie, CD163 jest badany jako biomarker stanów zapalnych i potencjalny cel terapeutyczny.

Ze względu na różnice w mechanizmach dotyczących wychwytu Hb przez CD163 pomiędzy układem ludzkim a mysim, translacja badań nie jest oczywista [80]. We wcześniejszych badaniach rolę CD163 w wychwycie Hb stwierdzono głównie przez nadekspresję CD163 w komórkach nabłonkowych, takich jak ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK293) czy chemiczne komórki jajnika (CHO). Nie są to idealne modele dobrze oddające fizjologiczną funkcję tego receptora. Natomiast zaangażowanie CD163 w ludzkich makrofagach badano przy użyciu poliklonalnych przeciwciał blokujących CD163 [56][89], jednakże to podejście może prowadzić do szybkiej internalizacji zopsonizowanego receptora razem z dużą ilością błony komórkowej, powodując zahamowanie pobierania Hb np. przez zahamowanie makropinocytozy, która wymaga znacznych ilości błony. Uzyskane przez nas wyniki nie wykluczają wkładu makrofagów w wychwyty Hb w warunkach hemolitycznych, ponieważ zaobserwowano, że wraz ze wzrostem dawki Hb podanej do krążenia, wzrasta pobieranie Hb przez KC. W naszych badaniach wychwyty Hb zweryfikowano *in vivo* pokazując, że LSEC jakościowo i ilościowo przewyższają w tym zadaniu KC i makrofagi śledzionowe posiadające receptor CD163 (Ryc. 17). Pozostaje do ustalenia, w jakim stopniu wychwyty Hb za pośrednictwem LSEC chroni inne narządy w zaburzeniach hemolitycznych oraz czy funkcje LSEC są zaburzone w takich warunkach.

### 5.3 Śródbłonki

Wśród organów charakteryzujących się obecnością naczyń zatokowych, oprócz wątroby można wymienić także śledzionę i szpik kostny. Zatokowe komórki śródbłonka tych organów, podobnie jak w przypadku wątroby, nie są tylko „biernymi” przewodami dostarczającymi tlen i składniki odżywcze, ale wspierają rozwój i regenerację organów poprzez wydzielanie tkankowo specyficznych parakrynych czynników wzrostu [27]. Na przykład komórki śródbłonka szpiku kostnego wydzielają ligand szlaku sygnałowego Notch niezbędny do odtworzenia hematopoezy po chemioterapii i radioterapii [90]. Makrofagi rozmieszczone wzdłuż naczyń zatokowych odpowiadają za wychwyty egzogennych patogenów i zniszczonych komórek. Ze względu na rolę śledzionowych RPM w metabolizmie Hb i usuwaniu martwych erytrocytów, w niniejszej pracy porównano zdolność do wychwyty Hb pomiędzy populacjami zatokowych komórek śródbłonkowych

i makrofagów w wątrobie i śledzionie. Wychwyty Hb zbadano także w zatokowym śródbłonku szpiku kostnego i nie-zatokowym śródbłonku aorty. Wykorzystując bioobrazowanie i cytometrię przepływową nie zaobserwowano akumulacji Hb w komórkach szpiku kostnego i aorty (Ryc. 8). Badania wykazały niezwykłą zdolność LSEC do internalizacji Hb w porównaniu z innymi analizowanymi typami komórek, gdzie dla LSEC w zależności od dawki 80%-98% komórek pobrało Hb. Zdolność wychwytywania Hb przez KC i komórki śródbłonka śledziony była stopniowo zwiększana wraz z dawką Hb, podczas gdy RPM pobierały Hb tylko przy najwyższej podanej dawce (Ryc. 17). Powyższe dane sugerują, że LSEC funkcjonują jako główne komórki zmiatające wolną Hb, zarówno przy niskich jak i wysokich stężeniach. W przypadku wysokich dawek Hb- odzwierciedlających warunki hemolityczne, funkcja LSEC jest wspierana przez makrofagi wątroby i śledziony oraz komórki śródbłonka śledziony.

#### 5.4 Makropinocytoza

Funkcje wychwyty substancji przez LSEC w naczyniach zatokowych przypisywano dotychczas ich aktywności endocytarnej i powierzchniowej ekspresji receptorów zmiatających [25]–[27]. Zaprezentowane tutaj badania *in vivo* oraz na komórkach pierwotnych pokazały, że LSEC pobierają znaczniki fazy płynnej takie jak albumina (Ryc. 20) i dekstran (Ryc.24), co oznacza, że są one zdolne do makropinocytozy, podobnie jak makrofagi i komórki dendrytyczne, które w ten sposób mogą pobierać antygeny prezentowane następnie na ich powierzchni [91]. Zaobserwowano, że rozmiar makropinosomów, w których zlokalizowana jest Hb (Ryc. 24A), odpowiada makropinosomom konstytutywnym, które są mniejsze niż te, które powstają po stymulacji komórek [92]. W badaniach, w których porównywano mechanizm wychwyty antygeny przez komórki dendrytyczne i LSEC pokazano, że obydwa rodzaje komórek pobierały dekstran i albuminę z taką samą efektywnością [93] [94]. Wyniki te sugerują, że LSEC mogą także internalizować antygeny za pomocą makropinocytozy. Według literatury, komórki śródbłonka wykazują niski poziom makropinocytozy konstytutywnej [71], ale proces ten może być stymulowany przez czynniki wzrostu lub patogeny. Jednym z przykładów może być badanie, w którym pokazano, że komórki śródbłonka aorty w odpowiedzi na płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. PDGF) intensyfikują proces marszczenia błony,

który bazalnie jest niski [95]. Komórki śródbłonka mózgu za pomocą makropinocytozy internalizują wirusa HIV-1 oraz bakterię *Escherichia coli* K1, natomiast komórki śródbłonka żyły pępowinowej pobierają w ten sposób wirusa mięsaka Kaposiego [71]. Opisano również udział makropinocytozy w pobieraniu końcowych produktów glikacji białek (AGE's) przez komórki śródbłonka nerek [96]. Zdolność LSEC do konstytutywnej makropinocytozy opisana w tej pracy odróżnia je od śródbłonek innych narządów, w których proces ten musi zostać zainicjowany przez czynniki wzrostu lub obecność patogenów. Ostatnie doniesienia naukowe sugerują, że ligandy Wnt powodują niezależną od receptora endocytozę cząsteczek takich jak BSA i dekstran, będące typowymi markerami makropinocytozy [73] [74]. Ścieżka sygnałowa Wnt reguluje wiele procesów podczas rozwoju embrionalnego, w tym angiogenezę i organogenezę oraz powiązana jest z wieloma nowotworami, chorobami neurologicznymi oraz utrzymaniem gęstości kości u dorosłych. Aby doszło do transdukcji sygnału, ligandy Wnt są endocytowane w sposób zależny od klatryny [97]. Badania przeprowadzone na komórkach nowotworowych jelita grubego, które charakteryzuje akumulacja  $\beta$ -kateniny w jądrze komórkowym oraz intensywna makropinocytoza, wykazały, że zablokowanie makropinocytozy inhibitorem EIPA powoduje spadek ilości jądrowej  $\beta$ -kateniny [76]. Akumulacja jądrowej  $\beta$ -kateniny jest markerem aktywnego szlaku Wnt, zatem wyniki te pokazują, że makropinocytoza jest istotnym procesem dla funkcjonowania tej ścieżki sygnałowej. Dodatkowo, badania przeprowadzone na embrionach *Xenopus laevis* wykazały, że zahamowanie negatywnego regulatora ścieżki Wnt - GSK3 $\beta$  chlorkiem litu, spowodowało utworzenie się makropinosomów i ich szybki transfer do lizosomów. Wpływ zahamowania GSK3 $\beta$  na makropinocytozę był porównywalny to tego, który uzyskano poprzez stymulację czynnikiem Wnt3a. Obserwacja ta potwierdza, że ligandy Wnt sekwestrują GSK3 $\beta$  umożliwiając translokację  $\beta$ -kateniny do jądra komórkowego i uruchomienie transkrypcji genów docelowych [98]. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że zablokowanie endocytozy klatrynozależnej za pomocą CPZ, nie wpłynęło znacząco na pobieranie Hb przez pierwotne komórki LSEC, natomiast zahamowanie makropinocytozy inhibitorem EIPA znacznie zmniejszyło pobieranie Hb (Ryc. 22 i 23). Dodatkowo inhibicja czynników kluczowych dla ścieżki sygnałowej Wnt-GTPazy Cdc42 i  $\beta$ -kateniny, także miała istotny efekt na zahamowanie pobierania Hb (Ryc. 22). Powyższe wyniki sugerują, że komórki LSEC pobierają wolną Hb za pomocą

makropinocytozy, która zależna jest od działania kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt. Lepsze poznanie mechanizmu, za pomocą którego sygnaling  $\beta$ -kateniny podtrzymuje makropinocytozę w LSEC i sprawdzenie, czy jej blokada farmakologiczna osłabiłaby wychwytywanie Hb przez wątrobę, wymaga dalszych badań.

## 5.5 Choroby hemolityczne

Kluczową funkcją Hb w erytrocytach jest wiązanie i transport tlenu z płuc do wszystkich tkanek organizmu w celu zaspokojenia ich potrzeb metabolicznych. Hemoliza skutkująca uwolnieniem wolnej Hb i hemu występuje w wielu stanach chorobowych oraz podczas interwencji klinicznych, w tym w niedokrwistościach genetycznych i nabytych, takich jak niedokrwistość sierpowatokrwinkowa, oparzenia, krążenie pozaustrojowe czy masowe transfuzje krwi. W wyniku ostrej hemolizy wewnątrznaczyniowej, znaczne ilości wolnej Hb przedostają się do osocza, co prowadzi do stanu zwanego hemoglobinemią. Nadmiar wolnej Hb filtrowany jest przez nerki, które następnie wydalają Hb do moczu powodując hemoglobinurię [99]. Hemoglobinuria może prowadzić do ostrej niedokrwiennej martwicy cewek nerkowych, wynikającej ze zdolności wolnej Hb do wiązania tlenu azotu (NO), kluczowej cząsteczki regulującej napięcie naczyniowe. Hemoglobina może ulegać reakcjom utleniania, które wytwarzają reaktywne formy tlenu, potencjalnie powodując uszkodzenie komórek [55]. Obecnie stosowane praktyki medycyny transfuzyjnej mają na celu zminimalizowanie powyższych zagrożeń. Niedobór ludzkiej krwi do transfuzji osiągnął krytyczny poziom w wielu miejscach na całym świecie, co generuje potrzebę opracowania zastępczych terapeutycznych nośników tlenu [100]. Chociaż nie istnieje powszechnie akceptowany lub zatwierdzony na całym świecie substytut krwi, produkt bazujący na spolimeryzowanej Hb jest obecnie dopuszczony do stosowania w Południowej Afryce, Rosji i w wyjątkowych przypadkach w USA [101]. Polimeryzacja cząsteczek Hb znacząco zwiększa rozmiar pozakomórkowej Hb co minimalizuje ekstrawazację i wpływa na wydłużenie okresu półtrwania Hb w krążeniu [102]. Istotnym zagadnieniem w kwestii stosowania takich terapeutyków są patofizjologiczne zjawiska, które zależne są od stężenia pozakomórkowej Hb w krążeniu i w tkankach. Zdolność do wychwytywania wolnej Hb pochodzącej z fizjologicznej

puli umierających erytrocytów i łagodnej hemolizy jest jedną z funkcji Hp. W zależności od stopnia nasilenia hemolizy, poziom Hp w osoczu może się obniżyć czyniąc ten mechanizm detoksykacyjny nieskutecznym. W przypadku obniżenia się poziomu Hp, rolę w wychwycie wolnej Hb mogą przejmować dodatkowe mechanizmy. Jak opisano w niniejszej pracy, Hb może być pobierana przez LSEC za pomocą makropinocytozy lub KC poprzez mechanizm niezależny od formowania się kompleksu Hb/Hp i jego wychwyt przez receptor CD163 [80]. W przypadku nasilonej hemolizy w proces ten mogą się angażować RPM i komórki śródbłonna śledziony. Dawki Hb podane myszom, które wykorzystano do badania tego procesu, zostały dobrane tak, aby nie wysycić naczyniowej Hp. Według danych literaturowych w warunkach fizjologicznych u myszy, poziom Hp wysycony jest przy 50 µg wolnej Hb na 10 g masy ciała [80]. Niskie dawki Hb podane myszom- 1 µg/mysz i 10 µg/mysz (czyli dawki poniżej stężeń wysycających Hp), pozwoliły na zbadanie wpływu Hp na pobieranie tego białka. Efekty ostrej hemolizy uzyskano podając myszom 10 mg Hb, czyli dawkę która odpowiada ilości Hb wydzielonej podczas hemolizy RBC zawartych w 100 µl krwi. Tak więc podana Hb była w nadmiarze w stosunku do dostępnej Hp, co pozwoliło na analizę wychwytu zarówno kompleksu Hb/Hp jak i wolnej Hb.

Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa to wrodzona choroba spowodowana nieprawidłową budową łańcucha  $\beta$  w Hb. Tak zmodyfikowaną Hb określa się jako HbS, ma ona mniejsze powinowactwo do tlenu niż prawidłowa HbA. Niskie stężenie tlenu powoduje polimeryzację Hb, przez co erytrocyty przyjmują sierpowaty kształt i są skłonne do szybszego rozpadu [103]. Pozakomórkowa Hb ogranicza biodostępność NO, powodując dysfunkcję śródbłonna i zwężenie naczyń krwionośnych. Uszkodzenie śródbłonna ma kluczowe znaczenie dla patogenezy wielu powikłań niedokrwistości sierpowatokrwinkowej. Uszkodzenia wątroby wynikające z obecności sierpowatych erytrocytów w naczyniach i niedotlenienia, są ważną przyczyną śmiertelności pacjentów z niedokrwistością sierpowatokrwinkową [104].

Badania opisane w niniejszej pracy wykazały, że podanie wolnej Hb myszom, powoduje naciek monocytów w wątrobie i wzrost poziomu ekspresji genu *Ccl2* - cytokiny, która rekrutuje monocyty, limfocyty T i komórki dendrytyczne w miejsca stanu zapalnego (Ryc. 16B). Ponadto, po podaniu Hb w wątrobie zaobserwowano wzrost ekspresji genu *Hmox1* kodującego oksygenazę hemową 1 -enzymu odpowiadającego za rozpad hemu

do żelaza, biliwerdyny i tlenku węgla (Ryc. 16C). Wzrost poziomu HO-1 jest także markerem stresu oksydacyjnego [105]. Wyniki te sugerują, że LSEC nie tylko pobierają Hb, ale także biorą udział w jej metabolizmie. W kontekście chorób hemolitycznych, warto byłoby dokładniej zbadać czy wysoki poziom wychwytu Hb w LSEC powoduje w nich stres oksydacyjny, który razem z indukowanym stanem zapalnym może przyczyniać się do patologii śródbłonna w tych chorobach.

Zgodnie z literaturą, KC odpowiedzialne są za usuwanie starzejących się komórek z wątroby i krążenia. Głównie proces ten dotyczy starzejących się lub martwych RBC i płytek krwi [38], [106]. KC pochłaniają RBC, degradują ich komponenty i eksportują żelazo przez ferroportynę błonową, które następnie może być wykorzystane do utworzenia nowych RBC [107]. Ponadto obecność uszkodzonych RBC jest charakterystyczna dla nabytych i dziedzicznych chorób hemolitycznych [54]. W niniejszej pracy wykazano, że uszkodzone przez stres cieplny RBC pobierane były przez KC, co potwierdza dane literaturowe. Ponadto, jednoczesne podanie Hb i RBC wykazało wyraźny podział zadań pomiędzy LSEC i KC-LSEC pobierały głównie wolną Hb, podczas gdy KC odpowiedzialne były za pobieranie uszkodzonych RBC (Ryc. 21). Nieopublikowane badania naszego zespołu wykazały, że nieuszkodzone RBC zostały pobrane głównie przez śledzionowe RPM, natomiast za pobieranie głównych produktów hemolizy jakimi są błony RBC i Hb, odpowiedzialne są odpowiednio KC i LSEC. Zgodnie z literaturą, wyniki te mogą świadczyć o skutecznej fagocytozie nienaruszonych RBC przez śledzionowe RPM, podczas gdy wątroba odpowiedzialna jest za usuwanie produktów hemolizy [45] [63].

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że wbrew wcześniejszym doniesieniom o dominującej roli makrofagów w wychwycie wolnej Hb, to LSEC są główną populacją komórek wykonującą to zadanie. W przypadku ostrej hemolizy, kiedy uwalniane są duże ilości Hb, LSEC wspierane są w tej funkcji przez KC, RPM i komórki śródbłonna śledziony. Ponadto wykazano, że pobieranie Hb przez LSEC jest niezależne od Hp i receptora CD163, a proces ten zachodzi za pomocą makropinocytozy zależnej od kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt. Z uwagi na fakt, że zjawisko to opisano w niniejszej rozprawie po raz pierwszy, wymaga ono dalszych badań, m.in. nad tym jaką rolę mogą pełnić LSEC w detoksykacji Hb w warunkach hemolizy oraz jaki wpływ na patologię śródbłonna w chorobach hemolitycznych może mieć wysoki poziom Hb w LSEC.

## 6. Wnioski

Na podstawie analizy wyników uzyskanych w części doświadczalnej niniejszej pracy, wyciągnięto następujące wnioski:

- LSEC są główną populacją komórek wątroby odpowiedzialną za pobieranie wolnej Hb u myszy.
- LSEC pobierają wolną Hb za pomocą makropinocytozy, w sposób niezależny od Hp i receptora CD163.
- Usuwanie produktów hemolizy zachodzi w wątrobie, gdzie występuje specjalizacja komórkowa - KC są odpowiedzialne za wychwyt zniszczonych RBC, a LSEC za pobieranie wolnej Hb.
- LSEC biorą udział w metabolizmie pobranej Hb.



## Bibliografia

- [1] G. Rishi and V. N. Subramaniam, "The liver in regulation of iron homeostasis," *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 313, no. 3, pp. G157–G165, Jun. 2017, doi: 10.1152/ajpgi.00004.2017.
- [2] C. Ding *et al.*, "A Cell-type-resolved Liver Proteome.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 15, no. 10, pp. 3190–3202, Oct. 2016, doi: 10.1074/mcp.M116.060145.
- [3] J. Feher, "8.4 - Pancreatic and Biliary Secretion," J. B. T.-Q. H. P. (Second E. Feher, Ed. Boston: Academic Press, 2017, pp. 810–820. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00080-X>.
- [4] Z. Zhou, M.-J. Xu, and B. Gao, "Hepatocytes: a key cell type for innate immunity," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 13, no. 3, pp. 301–315, 2016, doi: 10.1038/cmi.2015.97.
- [5] Z. Kmiec, "Introduction — Morphology of the Liver Lobule," no. Table 1, pp. 1–6, 2001, doi: 10.1007/978-3-642-56553-3\_1.
- [6] R. J. Schulze, M. B. Schott, C. A. Casey, P. L. Tuma, and M. A. McNiven, "The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine.," *J. Cell Biol.*, vol. 218, no. 7, pp. 2096–2112, Jul. 2019, doi: 10.1083/jcb.201903090.
- [7] B. Vollmar and M. D. Menger, "The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair.," *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 4, pp. 1269–1339, Oct. 2009, doi: 10.1152/physrev.00027.2008.
- [8] R. van Furth, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector, and H. L. Langevoort, "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.," *Bull. World Health Organ.*, vol. 46, no. 6, pp. 845–852, 1972.
- [9] S. Eriksson, J. R. Fraser, T. C. Laurent, H. Pertoft, and B. Smedsrød, "Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver.," *Exp. Cell Res.*, vol. 144, no. 1, pp. 223–228, Mar. 1983, doi: 10.1016/0014-4827(83)90458-5.
- [10] B. Smedsrød, J. Melkko, N. Araki, H. Sano, and S. Horiuchi, "Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells.," *Biochem. J.*, vol. 322 ( Pt 2, no. Pt 2, pp. 567–573, Mar. 1997, doi: 10.1042/bj3220567.
- [11] L. D. DeLeve and A. C. Maretta-Mira, "Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update," *Semin. Liver Dis.*, vol. 37, no. 4, pp. 377–387, 2017, doi: 10.1055/s-0037-1617455.
- [12] S. Bhandari *et al.*, "Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages," *BMC Mol. Cell Biol.*, vol. 21, no. 1, p. 85, 2020, doi: 10.1186/s12860-020-00331-9.
- [13] L. D. DeLeve, "Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration.," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 5, pp. 1861–1866, May 2013, doi: 10.1172/JCI66025.
- [14] E. Torsney and Q. Xu, "Resident vascular progenitor cells.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 50, no. 2, pp. 304–311, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.006.
- [15] L. Wang, X. Wang, G. Xie, L. Wang, C. K. Hill, and L. D. DeLeve, "Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats.," *J. Clin. Invest.*, vol.

- 122, no. 4, pp. 1567–1573, Apr. 2012, doi: 10.1172/JCI58789.
- [16] S. Kaur *et al.*, “Circulating Endothelial Progenitor Cells Present an Inflammatory Phenotype and Function in Patients With Alcoholic Liver Cirrhosis–,” *Frontiers in Physiology*, vol. 9. 2018. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00556>
- [17] M. Z. 1007\_s1045.-021-09780-y-citation. ri. Ratajczak, J. Ratajczak, M. Suszynska, D. M. Miller, M. Kucia, and D.-M. Shin, “A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells.,” *Circ. Res.*, vol. 120, no. 1, pp. 166–178, Jan. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309362.
- [18] H. Qian, S. Johansson, P. McCourt, B. Smedsrød, M. Ekblom, and S. Johansson, “Stabilins are expressed in bone marrow sinusoidal endothelial cells and mediate scavenging and cell adhesive functions.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 3, pp. 883–886, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.068.
- [19] A. T. Nguyen-Lefebvre and A. Horuzsko, “Kupffer Cell Metabolism and Function.,” *J. Enzymol. Metab.*, vol. 1, no. 1, 2015.
- [20] S. Shetty, P. F. Lalor, and D. H. Adams, “Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 15, no. 9, pp. 555–567, 2018, doi: 10.1038/s41575-018-0020-y.
- [21] J. Poisson *et al.*, “Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases,” *J. Hepatol.*, vol. 66, no. 1, pp. 212–227, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009.
- [22] K. Auvinen *et al.*, “Fenestral diaphragms and PLVAP associations in liver sinusoidal endothelial cells are developmentally regulated.,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 15698, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52068-x.
- [23] A. Limmer *et al.*, “Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 12, pp. 1348–1354, 2000, doi: 10.1038/82161.
- [24] X. Xie *et al.*, “HBeAg induces liver sinusoidal endothelial cell activation to promote intrahepatic CD8 T cell immunity and HBV clearance,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 18, no. 11, pp. 2572–2574, 2021, doi: 10.1038/s41423-021-00769-7.
- [25] F. Cabral *et al.*, “Stabilin receptors clear LPS and control systemic inflammation.,” *iScience*, vol. 24, no. 11, p. 103337, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.103337.
- [26] E. Pandey, A. S. Nour, and E. N. Harris, “Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease.,” *Front. Physiol.*, vol. 11, p. 873, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00873.
- [27] P.-S. Koch, K. H. Lee, S. Goerdt, and H. G. Augustin, “Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells,” *Angiogenesis*, vol. 24, no. 2, pp. 289–310, 2021, doi: 10.1007/s10456-021-09780-y.
- [28] K. K. Sørensen, J. Simon-Santamaria, R. S. McCuskey, and B. Smedsrød, “Liver Sinusoidal Endothelial Cells,” *Comprehensive Physiology*. pp. 1751–1774, Sep. 20, 2015. doi: <https://doi.org/10.1002/cphy.c140078>.
- [29] A. M. Woltman, A. Boonstra, M. Naito, and P. J. M. Leenen, “Kupffer Cells in Health and Disease.,” *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*. pp. 217–247,

- Aug. 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-1311-4\_10.
- [30] S. Bhandari, A. K. Larsen, P. McCourt, B. Smedsrød, and K. K. Sørensen, "The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease," *Front. Physiol.*, vol. 12, no. October, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.757469.
- [31] T. Seternes, K. Sørensen, and B. Smedsrød, "Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 11, pp. 7594–7597, May 2002, doi: 10.1073/pnas.102173299.
- [32] L. Speilberg, O. Evensen, and P. Nafstad, "Liver of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a light, transmission, and scanning electron microscopic study, with special reference to the sinusoid.," *Anat. Rec.*, vol. 240, no. 3, pp. 291–307, Nov. 1994, doi: 10.1002/ar.1092400302.
- [33] M. Naito, G. Hasegawa, Y. Ebe, and T. Yamamoto, "Differentiation and function of Kupffer cells.," *Med. electron Microsc. Off. J. Clin. Electron Microsc. Soc. Japan*, vol. 37, no. 1, pp. 16–28, Mar. 2004, doi: 10.1007/s00795-003-0228-x.
- [34] G. Sichel, M. Scalia, and C. Corsaro, "Amphibia Kupffer cells.," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 57, no. 6, pp. 477–490, Jun. 2002, doi: 10.1002/jemt.10101.
- [35] S. Yona *et al.*, "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis.," *Immunity*, vol. 38, no. 1, pp. 79–91, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.
- [36] C. L. Scott *et al.*, "Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells," *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 10321, 2016, doi: 10.1038/ncomms10321.
- [37] A. W. Thomson and P. A. Knolle, "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 11, pp. 753–766, Nov. 2010, doi: 10.1038/nri2858.
- [38] L. J. Dixon, M. Barnes, H. Tang, M. T. Pritchard, and L. E. Nagy, "Kupffer cells in the liver.," *Compr. Physiol.*, vol. 3, no. 2, pp. 785–797, Apr. 2013, doi: 10.1002/cphy.c120026.
- [39] N. Mahmud *et al.*, "Hemoglobin A2 and heterogeneous diagnostic relevance observed in eight new variants of the delta globin gene," *Genes (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–10, 2021, doi: 10.3390/genes12111821.
- [40] M. H. Ahmed, M. S. Ghatge, and M. K. Safo, "Hemoglobin: Structure, Function and Allostery.," *Subcell. Biochem.*, vol. 94, pp. 345–382, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-41769-7\_14.
- [41] C. Thomas and A. B. Lumb, "Physiology of haemoglobin," *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, vol. 12, no. 5, pp. 251–256, Oct. 2012, doi: 10.1093/bjaceaccp/mks025.
- [42] C. S. Thom, C. F. Dickson, D. A. Gell, and M. J. Weiss, "Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 3, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a011858.
- [43] M. R. Mihailescu and I. M. Russu, "A signature of the T ---> R transition in human hemoglobin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 7, pp. 3773–3777, Mar. 2001, doi: 10.1073/pnas.071493598.
- [44] D. A. B. T.-C. V. A. Wilson, Ed., "Hemolysis," Saint Louis: W.B. Saunders, 2012, p. 939. doi:

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-9979-6.00405-0>.

- [45] T. R. L. Klei *et al.*, "Hemolysis in the spleen drives erythrocyte turnover.," *Blood*, vol. 136, no. 14, pp. 1579–1589, Oct. 2020, doi: 10.1182/blood.2020005351.
- [46] D. J. Schaer, F. Vinchi, G. Ingoglia, E. Tolosano, and P. W. Buehler, "Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development.," *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 415, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00415.
- [47] G. J. Kato, M. H. Steinberg, and M. T. Gladwin, "Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease.," *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 3, pp. 750–760, Mar. 2017, doi: 10.1172/JCI89741.
- [48] E. A. Hod *et al.*, "Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron.," *Blood*, vol. 118, no. 25, pp. 6675–6682, Dec. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-08-371849.
- [49] F. Rapido *et al.*, "Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis.," *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 1, pp. 375–382, Jan. 2017, doi: 10.1172/JCI90837.
- [50] M. H. Antonelou and J. Seghatchian, "Insights into red blood cell storage lesion: Toward a new appreciation," *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 55, no. 3, pp. 292–301, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.019>.
- [51] D. J. Schaer, P. W. Buehler, A. I. Alayash, J. D. Belcher, and G. M. Vercellotti, "Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins," *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1276–1284, 2013, doi: 10.1182/blood-2012-11-451229.
- [52] C. D. Reiter *et al.*, "Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease.," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 1383–1389, Dec. 2002, doi: 10.1038/nm1202-799.
- [53] M. T. Gladwin, J. H. Crawford, and R. P. Patel, "The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 36, no. 6, pp. 707–717, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032.
- [54] F. Vallelian, P. W. Buehler, and D. J. Schaer, "Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics," *Blood*, vol. 140, no. 17, pp. 1837–1844, 2022, doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2022015596>.
- [55] J. W. Deuel *et al.*, "Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response," *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 1, pp. e2064–e2064, 2016, doi: 10.1038/cddis.2015.392.
- [56] D. J. Schaer *et al.*, "CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin.," *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 373–380, Jan. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-03-1014.
- [57] J. D. Belcher *et al.*, "Plasma Hemoglobin and Heme Trigger Weibel Palade Body Exocytosis and Vaso-Occlusion in Transgenic Sickle Mice," *Blood*, vol. 118, no. 21, p. 896, 2011, doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V118.21.896.896>.
- [58] V. Hvidberg, M. B. Maniecki, C. Jacobsen, P. Højrup, H. J. Møller, and S. K. Moestrup, "Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes.," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2572–2579, Oct. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-03-1185.
- [59] V. Jeney, G. Balla, and J. Balla, "Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression

- of atherosclerosis.," *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 379, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00379.
- [60] M. J. Stark, A. K. Keir, and C. C. Andersen, "Does non-transferrin bound iron contribute to transfusion related immune-modulation in preterms?," *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, vol. 98, no. 5, pp. F424-9, Sep. 2013, doi: 10.1136/archdischild-2012-303353.
- [61] T. Yoshida, M. Prudent, and A. D'alessandro, "Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences.," *Blood Transfus.*, vol. 17, no. 1, pp. 27–52, Jan. 2019, doi: 10.2450/2019.0217-18.
- [62] Yehonatan Gottlieb *et al.*, "Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro," *Haematologica*, vol. 97, no. 7 SE-Articles, pp. 994–1002, Jul. 2012, doi: 10.3324/haematol.2011.057620.
- [63] L. A. Youssef *et al.*, "Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion," *Blood*, vol. 131, no. 23, pp. 2581–2593, 2018, doi: 10.1182/blood-2017-12-822619.
- [64] J. Canton, "Macropinocytosis: New Insights Into Its Underappreciated Role in Innate Immune Cell Surveillance.," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2286, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02286.
- [65] P. E. Marques, S. Grinstein, and S. A. Freeman, "SnapShot:Macropinocytosis.," *Cell*, vol. 169, no. 4, pp. 766-766.e1, May 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.031.
- [66] S. Dharmawardhane, A. Schürmann, M. A. Sells, J. Chernoff, S. L. Schmid, and G. M. Bokoch, "Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 10, pp. 3341–3352, Oct. 2000, doi: 10.1091/mbc.11.10.3341.
- [67] J. R. Watson, D. Owen, and H. R. Mott, "Cdc42 in actin dynamics: An ordered pathway governed by complex equilibria and directional effector handover.," *Small GTPases*, vol. 8, no. 4, pp. 237–244, Oct. 2017, doi: 10.1080/21541248.2016.1215657.
- [68] J. A. Swanson and C. Watts, "Macropinocytosis.," *Trends Cell Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 424–428, Nov. 1995, doi: 10.1016/s0962-8924(00)89101-1.
- [69] J. T. H. Wang, R. D. Teasdale, and D. Liebl, "Macropinosome quantitation assay," *MethodsX*, vol. 1, pp. 36–41, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.05.002>.
- [70] J. P. Lim and P. A. Gleeson, "Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps.," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 89, no. 8, pp. 836–843, Nov. 2011, doi: 10.1038/icb.2011.20.
- [71] X. P. Lin, J. D. Mintern, and P. A. Gleeson, "Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences.," *Membranes (Basel)*, vol. 10, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.3390/membranes10080177.
- [72] G. Redelman-Sidi *et al.*, "The Canonical Wnt Pathway Drives Macropinocytosis in Cancer.," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 16, pp. 4658–4670, Aug. 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3199.
- [73] N. Tejada-Muñoz, L. V Albrecht, M. H. Bui, and E. M. De Robertis, "Wnt canonical pathway activates macropinocytosis and lysosomal degradation of extracellular proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 21, pp. 10402–10411, May 2019, doi: 10.1073/pnas.1903506116.
- [74] L. V Albrecht, D. Ploper, N. Tejada-Muñoz, and E. M. De Robertis, "Arginine methylation is required for canonical Wnt signaling and endolysosomal trafficking.," *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 23, pp. E5317–E5325, Jun. 2018, doi: 10.1073/pnas.1804091115.
- [75] V. F. Taelman *et al.*, “Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes.,” *Cell*, vol. 143, no. 7, pp. 1136–1148, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.034.
- [76] L. V Albrecht *et al.*, “GSK3 Inhibits Macropinocytosis and Lysosomal Activity through the Wnt Destruction Complex Machinery.,” *Cell Rep.*, vol. 32, no. 4, p. 107973, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107973.
- [77] T. Leibing *et al.*, “Angiocrine Wnt signaling controls liver growth and metabolic maturation in mice.,” *Hepatology*, vol. 68, no. 2, pp. 707–722, Aug. 2018, doi: 10.1002/hep.29613.
- [78] C. Géraud *et al.*, “Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1.,” *Hepatology*, vol. 52, no. 1, pp. 313–326, Jul. 2010, doi: 10.1002/hep.23618.
- [79] D. Klein *et al.*, “Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway.,” *Hepatology*, vol. 47, no. 3, pp. 1018–1031, Mar. 2008, doi: 10.1002/hep.22084.
- [80] A. Etzerodt, M. Kjolby, M. J. Nielsen, M. Maniecki, P. Svendsen, and S. K. Moestrup, “Plasma clearance of hemoglobin and haptoglobin in mice and effect of CD163 gene targeting disruption.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 17, pp. 2254–2263, Jun. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4605.
- [81] M. Z. Alam, S. Devalaraja, and M. Haldar, “The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology.,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 33, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00033.
- [82] D. R. Janz and L. B. Ware, “The role of red blood cells and cell-free hemoglobin in the pathogenesis of ARDS.,” *J. intensive care*, vol. 3, p. 20, doi: 10.1186/s40560-015-0086-3.
- [83] B.-S. Ding *et al.*, “Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration.,” *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 310–315, Nov. 2010, doi: 10.1038/nature09493.
- [84] Ł. Kiraga *et al.*, “Biodistribution PET/CT Study of Hemoglobin-DFO-(89)Zr Complex in Healthy and Lung Tumor-Bearing Mice.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21144991.
- [85] S. Fagoonee *et al.*, “Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 166, no. 4, pp. 973–983, Apr. 2005, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62319-X.
- [86] J. Gburek *et al.*, “Megalin and Cubilin are Endocytic Receptors Involved in Renal Clearance of Hemoglobin,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 2, 2002, [Online]. Available: [https://journals.lww.com/jasn/Fulltext/2002/02000/Megalin\\_and\\_Cubilin\\_are\\_Endocytic\\_Receptors.16.aspx](https://journals.lww.com/jasn/Fulltext/2002/02000/Megalin_and_Cubilin_are_Endocytic_Receptors.16.aspx)
- [87] E. I. Christensen and H. Birn, “Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 258–267, 2002, doi: 10.1038/nrm778.
- [88] S.-K. Lim *et al.*, “Increased Susceptibility in Hp Knockout Mice During Acute Hemolysis,” *Blood*, vol. 92, no. 6, pp. 1870–1877, 1998, doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V92.6.1870>.

- [89] M. Kristiansen *et al.*, "Identification of the haemoglobin scavenger receptor.," *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 198–201, Jan. 2001, doi: 10.1038/35051594.
- [90] S. K. Ramasamy, A. P. Kusumbe, L. Wang, and R. H. Adams, "Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone.," *Nature*, vol. 507, no. 7492, pp. 376–380, Mar. 2014, doi: 10.1038/nature13146.
- [91] C. C. Norbury, L. J. Hewlett, A. R. Prescott, N. Shastri, and C. Watts, "Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages.," *Immunity*, vol. 3, no. 6, pp. 783–791, Dec. 1995, doi: 10.1016/1074-7613(95)90067-5.
- [92] J. Canton, D. Schlam, C. Breuer, M. Gütschow, M. Glogauer, and S. Grinstein, "Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages," *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 11284, 2016, doi: 10.1038/ncomms11284.
- [93] S. C. Katz, V. G. Pillarisetty, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo, "Liver Sinusoidal Endothelial Cells Are Insufficient to Activate T Cells," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 1, pp. 230–235, Jul. 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.1.230.
- [94] M. K. Connolly *et al.*, "In Hepatic Fibrosis, Liver Sinusoidal Endothelial Cells Acquire Enhanced Immunogenicity," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 4, pp. 2200–2208, Aug. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1000332.
- [95] S. Wennström *et al.*, "Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling.," *Curr. Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 385–393, May 1994, doi: 10.1016/s0960-9822(00)00087-7.
- [96] M. A. Gallicchio and L. A. Bach, "Uptake of advanced glycation end products by proximal tubule epithelial cells via macropinocytosis," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 12, pp. 2922–2932, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.024>.
- [97] J. T. Blitzer and R. Nusse, "A critical role for endocytosis in Wnt signaling," *BMC Cell Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 28, 2006, doi: 10.1186/1471-2121-7-28.
- [98] N. Tejada-Muñoz and E. M. De Robertis, "Lysosomes are required for early dorsal signaling in the *Xenopus* embryo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 119, no. 17, pp. 1–9, 2022, doi: 10.1073/pnas.2201008119.
- [99] M. Guerrero-Hue *et al.*, "Adverse effects of the renal accumulation of haem proteins. Novel therapeutic approaches," *Nefrologia*, vol. 38, no. 1, pp. 13–26, 2018, doi: 10.1016/j.nefro.2017.05.009.
- [100] G. W. Latson, "Perftoran: History, Clinical Trials, and Pathway Forward BT - Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics," H. Liu, A. D. Kaye, and J. S. Jahr, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 361–367. doi: 10.1007/978-3-030-95975-3\_36.
- [101] L. Chen, Z. Yang, and H. Liu, "Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Where Are We Now in 2023?," *Medicina*, vol. 59, no. 2. 2023. doi: 10.3390/medicina59020396.
- [102] A. Sen Gupta, "Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules.," *Shock*, vol. 52, no. 1S Suppl 1, pp. 70–83, Oct. 2019, doi: 10.1097/SHK.0000000000001009.
- [103] A. Dosunmu-Ogunbi *et al.*, "Endothelial superoxide dismutase 2 is decreased in sickle cell

- disease and regulates fibronectin processing," *Function*, vol. 3, no. 2, p. zqac005, Mar. 2022, doi: 10.1093/function/zqac005.
- [104] A. R. Suddle, "Management of liver complications in sickle cell disease.," *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.*, vol. 2019, no. 1, pp. 345–350, Dec. 2019, doi: 10.1182/hematology.2019000037.
- [105] X. Yang *et al.*, "Up-regulation of heme oxygenase-1 by celastrol alleviates oxidative stress and vascular calcification in chronic kidney disease," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 172, pp. 530–540, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.020>.
- [106] K. Ade, "Kupffer Cell Maintenance in Tissue Repair and Ageing Kupffer," 2022.
- [107] P. Slusarczyk and K. Mleczko-Sanecka, "The Multiple Facets of Iron Recycling," *Genes*, vol. 12, no. 9. 2021. doi: 10.3390/genes12091364.



# UCHWAŁA NR WAW2/138/2019

z dnia 13 września 2019 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

## § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1<sup>1</sup> ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Badanie farmakodynamiki wolnej hemoglobiny i jej lokalizacji komórkowej w wątrobie” z dnia 05 września 2019 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, adres: ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Tomasza Rygiela<sup>2</sup> przy udziale<sup>3</sup> -

Lokalna Komisja Etyczna:

## WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

## § 2

**W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:**

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: [PB2] badania podstawowe, sercowo naczyniowy układ krążenia krwi i limfy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>4</sup>:

Gatunek	Wiek/stadium	Liczba
Mysz domowa BALB/c	8-12 tygodni	320

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Tomasz Rygiel, Zofia Pilch, Marcin Skórzyński, Zuzanna Sas, Tułodziecka Karolina, Agata Osiak, Damian Strzemecki.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>5</sup> od 23.09.2019 do 31.07.2023 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>6</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: CePT WUM, Banacha 1B, 02-004 Warszawa.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

<sup>1</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

<sup>2</sup> imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

<sup>5</sup> Nie dłużej niż 5 lat

<sup>6</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

### § 3

#### **Uzasadnienie:**

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

### § 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
II Lokalna Komisja Etyczna  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8  
tel. 22 59-35622  
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA  
II Lokalnej Komisji Etycznej  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW  
/ Przewodnicząca Joanna Gromadzka-Ustrowska /  
(Podpis Przewodniczącej komisji)

#### Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

#### Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

#### Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

# UCHWAŁA NR WAW2/152/2020

z dnia 16 grudnia 2020 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie

## § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1<sup>1</sup> ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: **„Badanie efektu biologicznego wolnej hemoglobiny na komórki wątroby i rozwój stanu zapalnego”** z dnia 05 listopada 2020 roku, złożonego przez: Zakład Immunologii Wydziału Lekarskiego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, adres: ul. Jana Nielubowicza 5, 02-097 Warszawa, zaplanowanego przez Tomasza Rygla<sup>2</sup> przy udziale<sup>3</sup> -

Lokalna Komisja Etyczna:

## WYRAŻA ZGODĘ

**na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.**

## § 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, sercowo naczyniowy układ krążenia krwi i limfy [PB2].
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>4</sup>:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
Mysz domowa, szczep BALB/c	8-12 tyg.	328
Mysz domowa, szczep C57BL/6 knock-out (Hp-KO)	8-12 tyg.	30
Mysz domowa, szczep C57BL/6	8-12 tyg.	30

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Tomasz Rygiel, Marcin Skórzyński, Zuzanna Sas, Agata Osiak, Damian Strzemecki.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>5</sup> od 21.12.2020 do 20.12.2024 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>6</sup>: Zwierzętarnia Zakładu Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, ul. Banacha 1B.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany~~

<sup>1</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

<sup>2</sup> imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

<sup>5</sup> Nie dłużej niż 5 lat

<sup>6</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

### § 3

#### Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach pod kątem oceny etycznej. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2020 r. poz. 256) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż decyzja jest zgodna z wnioskiem strony.

### § 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
II Lokalna Komisja Etyczna  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8  
tel. 22 59-35622  
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA  
II Lokalnej Komisji Etycznej  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW  
  
/ Prof. dr/hab. Joanna Gromadzka-Ustrowska  
(Podpis Przewodniczącej Komisji)

#### Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

# UCHWAŁA NR WAW2/179/2021

z dnia 22 grudnia 2021 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie

## § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1<sup>1</sup> ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2021 r. poz. 1331), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „**Biodystrybucja i efekt działania na kom. wątroby wolnej hemoglobiny w organizmie**” z dnia 09.11.2021 roku, złożonego przez Zakład Immunologii Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, adres: ul. Jana Nielubowicza 5, 02-097 Warszawa, zaplanowanego przez Tomasza Rygla<sup>2</sup> przy udziale:<sup>3</sup> (nie dotyczy) Lokalna Komisja Etyczna:

## WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

## § 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, sercowo naczyniowy układ krążenia krwi i limfy [PB2].
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>4</sup>:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
Mysz domowa BALB/c	8 – 12 tygodni	90

1. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Tomasz Rygiel, Marcin Skórzyński, Zuzanna Sas, Cheda Łukasz, Paulina Hamankiewicz, Weronika Wargocka-Matuszewska.
2. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>5</sup> od 01.01.2022 do 31.12.2025 r.
3. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>6</sup>: (1) Zwierzętarnia Zakładu Immunologii WUM, ul. Banacha 1B, budynek CBP, 02-091 Warszawa, (2) Zwierzętarnia w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa.
4. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
5. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
6. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

<sup>1</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

<sup>2</sup> imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

<sup>5</sup> Nie dłużej niż 5 lat

<sup>6</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

### § 3

#### Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2021 r. poz. 1331). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach pod kątem oceny etycznej. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2020 r. poz. 256) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż decyzja jest zgodna z wnioskiem strony.

### § 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
II Lokalna Komisja Etyczna  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8  
tel. 22 59-35622

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA  
II Lokalnej Komisji Etycznej  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW  
*Monika*  
/ Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska /  
(Podpis Przewodniczącej Komisji)

#### Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

#### Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

#### Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

# UCHWAŁA NR WAW2/053/2022

z dnia 27 kwietnia 2022 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

## § 1

Działając na podstawie art. 51 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „**Biodystrybucja i efekt działania na kom. wątroby wolnej hemoglobiny w organizmie,**” z dnia 12.04.2022 roku, złożonego przez: Zakład Immunologii Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, adres: ul. Jana Nielubowicza 5, 02-097 Warszawa, zaplanowanego przez Tomasza Rygla<sup>1</sup>, a dotyczącego:

**zgody na wykorzystanie dodatkowych zwierząt w procedurach**

**zgody na wprowadzenie do wniosku nowych lub zmodyfikowanych pojedynczych czynności lub całych procedur**

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr WAW2/179/2021 z dnia: 22.12.2021r.

## WYRAŻA ZGODE

na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.

## § 2

**W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:**

1. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur po zatwierdzonych zmianach to: łagodna.
2. Doświadczenia będą przeprowadzane na dodatkowych gatunkach lub grupach gatunków: Mysz domowa (*Mus musculus*), wiek: 5-6 tygodni: 40 osobników.
3. W procedurach doświadczalnych wprowadza się następujące zmiany: dodanie dwóch dodatkowych grup do zmodyfikowanych procedur I i II (dodano jedną dodatkową czynność - podanie dożylnie roztworu liposomów w celu usunięcia tkankowych makrofagów).
4. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>2</sup>: nie dotyczy.

## § 3

### Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 51 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392). Po ocenie wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony wniosek został właściwie uzasadniony i nie wzbudza zastrzeżeń etycznych.

<sup>1</sup> imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>2</sup> Nie dłużej niż 5 lat

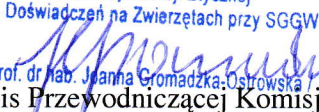
Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości wnioski strony.

#### § 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
II Lokalna Komisja Etyczna  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8  
tel. 22 59-35622

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA  
II Lokalnej Komisji Etycznej  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW  
  
/ Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska /  
(Podpis Przewodniczącej Komisji)

#### Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu