

Ny rozłom 2901p
A. J.

Kraków, 17.04.2024



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA

Pracy doktorskiej pani mgr Zuzanny Sas,
doktorantki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Tytuł pracy:

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

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

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

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

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

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

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

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

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

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



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621
fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

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

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

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



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621
fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

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

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

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

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



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621
fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl