

Dr hab. Katarzyna Piwocka
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 13.09.2021

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Braniewskiej zatytułowanej
" Zbadanie pobierania hemoglobiny przez makrofagi i jej przekazywania komórkom
nowotworowym"**

Rozprawa doktorska pani mgr Agaty Braniewskiej przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. med. Tomasza Rygla.

Badania podjęte przez doktorantkę wpisują się w zakres prac prowadzonych w zespole dr Rydla, a Założenia i Cele pracy przedstawione zostały jasno i klarownie. Doktorantka postawiła sobie za cel zbadanie pobierania hemoglobiny (Hb) przez makrofagi, weryfikację mechanizmu jej transferu do innych komórek, w tym komórek nowotworowych oraz dokładniejsze zrozumienie i charakterystykę mechanizmu przekazywania Hb.

Hemoglobina (Hb) – główne białko erytrocytów zawierające żelazo, ze względu na udział w transporcie tlenu, jest jednym z kluczowych białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania naszego organizmu. Jednocześnie, wolna hemoglobina wykazuje właściwości prozapalne i prooksydacyjne. Stąd obieg i metabolizm Hg, jej wychwyt w celu neutralizacji wolnej Hb, przekazywanie do komórek żernych oraz degradacja, jak też mechanizmy zapobiegające nadmiernej autooksydacji Hb są krytyczne dla zachowania prawidłowej homeostazy organizmu, a makrofagi, jako komórki zaangażowane w degradację wolnej Hb stanowią istotny element tego systemu. Jednocześnie, zaburzenia prawidłowego obiegu Hb związane są z groźnymi stanami patologicznymi, takimi jak hemoliza. Najnowsze prace wskazują także na możliwość wykorzystania naturalnego systemu transportu Hb jako nowoczesnego sposobu dostarczania leków, podnosząc znaczenie badań dotyczących tych zjawisk. Tematyka badań podjętych przez doktorantkę jest więc aktualna i bardzo ważna z punktu widzenia zarówno nauk podstawowych, jak i badań o charakterze translacyjnym, mogących przyczynić się do rozwoju nowoczesnych metod terapeutycznych bazujących na nowatorskich systemach dostarczania leków.

Doktorantka wykorzystała liczne metody *in vitro*, oraz prawidłowo dobrane modele komórkowe (linie komórkowe oraz komórki pierwotne), pozwalające na realizację postawionych celów. Prowadzone badania doprowadziły do odkrycia nowego zjawiska pobierania Hb przez makrofagi oraz przekazywania jej w formie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do komórek nowotworowych. To bardzo ciekawe i wartościowe obserwacje, które mogą stanowić początek dalszych badań.

Szczegółowe uwagi i komentarze

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Wstęp napisany jest bardzo dobrze i zawiera informacje wystarczające do wprowadzenia czytelnika w tematykę realizowanych badań. Na podkreślenie zasługuje staranna szata graficzna oraz klarowne i dobrze zrobione ryciny.

I tak, najpierw przedstawiono powstawanie i funkcje Hb oraz jej obieg i metabolizm, zwracając uwagę na cytotoksyczne właściwości wolnej Hb i mechanizmy zabezpieczające przed nadmierną autooksydacją. Doktorantka opisuje też dokładnie rolę makrofagów w metabolizmie hemoglobiny.

Kolejne podrozdziały poświęcone są różnym rodzajom transportu międzykomórkowego, w tym wykorzystującym połączenia szczelinowe (gap junctions), tunelujące nanorurki/nanotunele TNTs (tunneling nanotubes) oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe EVs (extracellular vesicles), którym poświęca więcej uwagi. Doktorantka opisuje mechanizmy powstawania, działanie oraz rodzaje transportowanych cargo. Chciałabym podkreślić, że bardzo istotne jest zaznaczenie w tej części aktualnego podejścia, w którym odchodzi się od ścisłego rozdziału pęcherzyków na egzosomy,

mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne ze względu tylko na ich wielkość. Aby określić typ pęcherzyków, potrzebne są także dane dotyczące przynajmniej ich pochodzenia oraz obecności specyficznych markerów (aktualną charakterystykę podtypów pęcherzyków przedstawiono w Tabeli 1). To ważne dla zachowania aktualnych rekomendacji, porządku nomenklatury oraz uniknięcia niewłaściwego nazewnictwa i podziału pęcherzyków.

Metodyka przedstawiona jest w pracy dość dokładnie i zawiera w dużej większości niezbędne dane. Nie znalazłam jednak informacji, czy i jak oceniano różnicowanie różnych typów komórek do makrofagów (Rozdział 3.5), które stanowiły jeden z podstawowych modeli badawczych.

Nie jest dla mnie także jasne, dlaczego w eksperymentach, w których wyciszano ekspresję M-Sec stosując specyficzne siRNA zastosowano różne końcowe stężenia specyficznego i negatywnego siRNA (odpowiednio 20 nM dla mSec siRNA i 50 nM dla neg siRNA). Prosiłabym o wyjaśnienie tej kwestii.

W części dotyczącej badań cytometrycznych nie zamieszczono informacji dotyczących kompensacji fluorochromów, zastosowanych kontroli FMO dla ustawienia parametrów i przykładowego schematu barwienia i strategii bramkowania dla PBMC znakowanych markerami CD3, CD14, CD56, CD19, w celu rozróżnienia subpopulacji monocytów, limfocytów B, komórek NK i limfocytów T, dodatkowo inkubowanych z fluorescencyjną hemoglobina w celu analizy jej pobierania (strona 47).

Pewne wątpliwości budzi też brak oceny czystości (kontaminacji innymi kompartmentami komórkowymi/błonowymi) frakcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Standardowo w takich przypadkach ocenia się markery specyficzne dla EVs, mitochondriów i błon mitochondrialnych oraz siateczki śródplazmatycznej. Jest to rekomendowane podejście zgodne z wytycznymi międzynarodowego towarzystwa ISEV.

Uzyskane **Wyniki** przedstawiono w sposób jasny i klarowny, z dbałością o odpowiednie przedstawienie graficzne.

Pierwsza część wyników dotyczy analizy pobierania Hb przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) oraz makrofagi. Różne subpopulacje komórek krwi rozdzielano cytometrycznie na podstawie markerów powierzchniowych i oceniano pobieranie przez nie fluorescencyjnej Hb, jednak jak już wspomniałam, nie pokazano tzw. strategii bramkowania aby ocenić rozdział populacji, w tym komórki, które pobrały fluorescencyjną Hb. Kolejny model stanowiły makrofagi, linie komórkowe jak i makrofagi różnicowane z ludzkiej linii monocytarnej THP-1, a pobieranie Hb oceniono cytometrycznie, jak i za pomocą oznaczenia poziomu białka w lizatach komórkowych metodą western blot.

Wyniki pokazujące poziom mRNA dla receptora CD163 w makrofagach różnych typów doktorantka podsumowała stwierdzeniem, że pobieranie Hb przez makrofagi może być niezależne od kanonicznej ścieżki zależnej od CD163. W mojej opinii, niski poziom ekspresji CD163 jest tylko przesłanką, ale jest niewystarczający do wysnucia takiego wniosku. Niezbędne w tym celu byłoby wyciszenie ekspresji CD163 i zbadanie pobierania Hb w takich warunkach.

W kolejnej części zbadano przekazywanie Hb z makrofagów do komórek nowotworowych, stosując różne modele eksperymentalne, w tym kohodowe. Doktorantka wykazała efektywny transfer z makrofagów do różnych typów komórek nowotworowych, zarówno w układach mysich jak i ludzkich. Chciałabym zapytać, czy taki a nie inny dobór komórek nowotworowych był czymś spowodowany, czy chodziło o przetestowanie nowotworów różnego pochodzenia. Zaobserwowane przekazywanie Hb zostało potwierdzone i dokładniej zbadane w serii dobrze zaplanowanych eksperymentów z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fluorescencji.

Doktorantka wykazała, że komórkami „biorcami” mogą być zarówno makrofagi, jak i komórki nowotworowe. Na Rycinach 26 B,D (wyniki cytometryczne przedstawiające transfer Hb) brakuje populacji negatywnej, na podstawie której wyznaczono granice pomiędzy populacją negatywną (bez fluorescencyjnej Hb) a pozytywną (która pobrała fluorescencyjną Hb). Jest to o tyle istotne, że na tej podstawie wyliczono odsetki komórek, które pobierały Hb (Rycina 26 A,C).

Następnie zbadano możliwy mechanizm transferu Hb z makrofagów do komórek nowotworowych, wykorzystując kohodowle, system Trans-well, medium kondycjonowane znad makrofagów oraz metody analizy zawartości i wielkości pęcherzyków. Interpretacja tych wyników, w połączeniu z wynikami uzyskanymi w dalszej części pracy dotyczącej udziału pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wydaje mi się nieco niespójna, zresztą doktorantka odnosi się później właściwie do ich rozbieżności w Dyskusji. Zahamowanie transferu Hb widoczne w systemie Trans-well z membraną o wielkości porów 1 μm (Rycina 28) sugeruje, że do przekazywania niezbędny jest bezpośredni kontakt dawca-biorca, a nie czynniki znajdujące się w medium kondycjonowanym, gdyż taka średnica porów nie powinna przeszkadzać transferowi pełnego medium kondycjonowanego, w tym pęcherzyków o wielkości 130 nm zawierających Hb (wielkość oznaczona eksperymentalnie z wykorzystaniem techniki NTA w dalszej części pracy). Z kolei eksperymenty przeprowadzone w dalszej części wskazują, że dodanie medium kondycjonowanego zarówno znad makrofagów jak i kohodowli jest wystarczające, aby zaszedł transfer Hb (Rycina 39). Co więcej, dalsze badania potwierdziły, że dodanie wyizolowanych pęcherzyków zawierających Hb do komórek nowotworowych jest wystarczające, aby zaszło pobieranie Hb (Rycina 43), co wskazuje jednak na pęcherzyki jako sposób transferu.

Jak doktorantka zauważa w Dyskusji, uzyskane wyniki nie są w pełni jednoznaczne. Sugeruje, że transferowi mogą ulegać często całe grupy pęcherzyków, co mogłoby mieć miejsce także w badanym układzie, i w tym kontekście membrana o średnicy porów 1 μm mogłaby przeszkadzać ich transferowi. Wątpliwości te rozwiałaby analiza medium z dolnej części poniżej membrany z wykorzystaniem techniki NTA, do której doktorantka miała dostęp, w celu sprawdzenia czy pęcherzyki zawierające Hb przedostały się/ lub nie przez membranę z porami o średnicy 1 μm . Czy wykonano takie eksperymenty? Pozwoliłyby one na znacznie klarowniejsze wyniki i bardziej jednoznaczne wnioski.

Kolejnym etapem pracy była próba wyjaśnienia roli cytoszkieletu aktynowego oraz mikrotubul w procesie przekazywania Hb. Doktorantka wykazała, że zablokowanie polimeryzacji aktyny niemal całkowicie zahamowało przekazywanie Hb, i podobne obserwacje dotyczyły zahamowania polimeryzacji mikrotubul. Interesujące wyniki uzyskano z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów mediatorów polimeryzacji aktyny, wskazujące na możliwe znaczenie kinazy ROCK.

Doktorantka zbadala także potencjalny udział struktur typu TNTs w międzykomórkowym transferze Hb. Wstępne obserwacje mikroskopowe wskazywały na obecność struktur przypominających TNTs, oraz obecność w nich Hb. Zastosowanie mechanicznego wytrząsania nie spowodowało obniżenia transferu (Rycina 35), jednak w mojej opinii bez potwierdzenia (poprzez liczenie ilości powstałych struktur), że rzeczywiście wytrząsanie zahamowało tworzenie TNTs, uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczną konkluzję przedstawioną w pracy, że mechaniczne wytrząsanie powodujące uszkodzenie TNTs nie wpływa na efektywność przekazywania Hb. Ten wniosek nie jest poparty odpowiednimi eksperymentami. Aby dodatkowo potwierdzić znaczenie TNTs wyciszono ekspresję M-Sec – białka opisanego jako regulator powstawania TNTs w makrofagach. Wyciszenie ekspresji białka M-Sec zarówno w makrofagach jak i w komórkach nowotworowych nie zmniejszyło przekazywania Hb, jednak aktualne badania wskazują, że nie zawsze jest ono niezbędne do tworzenia i aktywności TNTs.

O najważniejszych obserwacjach i kluczowych wynikach pisałam już w pierwszej części Recenzji, do części z nich odnoszę się jeszcze w zagadnieniach do dyskusji.

Dyskusja jest spójna, rzetelna i odnosi się w wyważony sposób i z wymaganą ostrożnością do uzyskanych wyników. Bardzo ciekawa jest część Dyskusji poświęcona wykorzystaniu procesu przekazywania Hb przez makrofagi w nowych systemach dostarczania leków. Wydaje się to szczególnie interesujące w przypadku hipoksyjnych guzów litych. Interesuje mnie jednak specyficzność takiego systemu oraz jego ukierunkowanie do komórek nowotworowych – zagadnienie, które chciałabym bardziej szczegółowo przedyskutować wskazując poniżej.

Jak już wspominałam, nie do końca przekonuje mnie interpretacja wyników dotyczących mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Zgadzałam się z doktorantką, że uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne wnioski. Swoje komentarze zawarłam już wcześniej. Być może w przekazywaniu Hb między komórkami uczestniczą różne mechanizmy jednocześnie/lub wymiennie i niezbędne są dogłębniejsze badania aby to wyjaśnić.

Za wartościową uważam część Dyskusji, w której doktorantka odnosi prowadzone badania do zagadnienia ogólnoustrojowej gospodarki żelazem i stanów patologicznych wynikających z jej zaburzenia. Pozwala to ocenić uzyskane wyniki w szerszym kontekście.

Chciałabym też podkreślić, o czym już wspominałam, istotny i zgodny z najnowszymi zaleceniami towarzystwa ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) komentarz dotyczący zniesienia ostrych podziałów na egzosomy, mikropęcherzyki oraz ciała apoptotyczne, bazując tylko na wielkości pęcherzyków, na rzecz ogólnego określenia pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (extracellular vesicles – EVs). Jest to związane z najnowszą wiedzą dotyczącą mechanizmów powstawania, specyficznych markerów i innych parametrów niezbędnych do określenia podgrup pęcherzyków. Pracę kończy Podsumowanie wyników oraz prawidłowo sformułowane Wnioski.

Po zapoznaniu się z rozprawą, chciałabym przedyskutować następujące zagadnienia:

1. Doktorantka proponuje, że zaobserwowane zjawisko pobierania Hb przez makrofagi i potem transportu Hb przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogłoby zostać wykorzystane w nowym systemie dostarczania leków do komórek nowotworowych. Jest to szczególnie interesujące w kontekście guzów litych, które są infiltrowane przez makrofagi. W związku z tym, że makrofagi towarzyszące nowotworowi są populacją zmieniającą dynamicznie swój stan (polaryzacja w kierunku M1 lub M2), a co za tym idzie dynamikę cytoszkieletu i błon komórkowych, chciałabym zapytać, czy wiadomo z badań zespołu lub literatury, czy i jak zmienia się dynamika pobierania Hb lub innych białek oraz potem wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w zależności od stanu makrofagów M1/M2, i jak mogłoby to wpływać na potencjalny system transportu leku zaproponowany przez doktorantkę.

2. Bardzo ciekawy wydał mi się wątek poruszony w Dyskusji dotyczący wykorzystania różnej lokalizacji Hb na nośniku (na powierzchni i wewnątrz) do obniżenia warunków hipoksyjnych w obrębie guza. Czy mogłabym prosić o rozwinięcie tego wątku i podanie informacji na temat prowadzonych aktualnie badań w tym zakresie.

3. Uzyskane wyniki oraz dodatkowe dane niepublikowane opisane w rozprawie wskazują, że transfer Hb z makrofagów do komórek sąsiadujących nie jest specyficzny w kierunku rodzaju/typu komórek „akceptorów” i oprócz komórek nowotworowych Hb przekazywana jest także do innych makrofagów, fibroblastów i prawdopodobnie także innych typów komórek. Czy w związku z tym, nie jest to przeszkodą w zaproponowanym wykorzystaniu tego zjawiska do stworzenia systemu podawania leków skoniugowanych z Hb i transferu z makrofagów do komórek nowotworowych? Czy są próby stworzenia systemu umożliwiającego transfer makrofagów ukierunkowany specyficznie do konkretnego typu komórek-biorców.

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie wpływają na końcową wysoką i pozytywną ocenę niniejszej rozprawy. Rozprawa pani mgr Agaty Braniewskiej jest pracą bardzo wartościową i dostarczającą nowej wiedzy. W pracy postawiono istotny cel, który udało się doktorantce zrealizować, a uzyskane wyniki z pewnością staną się podstawą dalszych prac ze względu na ich wartość naukową i potencjalne wykorzystanie praktyczne.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie mgr Agaty Braniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Katarzyna Piwocka