

**Prof. zw. dr hab. Zbigniew Dąbrowski**

Instytut Rehabilitacji Klinicznej

AWF w Krakowie

Pracownia Fizjologii Krwi

Al. Jana Pawła II 78

31–571 KRAKÓW

Kraków, dnia 14 czerwca 2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr **ALEKSANDRY BEDNARZ** p.t. :

**„Rola nerek w procesie neutralizacji hemu i metabolizmie żelaza w przebiegu hiperbilirubinemii – badania prowadzone na modelu mysim”**

Gros rozprawy został oparty na dwóch publikacjach w których doktorantka jest pierwszym autorem wraz z 14 współautorami. Pierwsza z tych publikacji zatytuowana: **„Role of the kidneys in the redistribution of heme –derived iron during neonatal hemolysis in mice”**, opublikowana w *Scientific Reports* (natureresearch), złożona do druku 15 stycznia 2019 r, zaakceptowana do druku 19 czerwca 2019, pismo o impact factor 3,998, drug p.t. **„Eacerbation of neonatal hemolysis and impaired renal iron handing in heme oxygenase 1- deficient mice”**, opublikowana w *International Journal of Molecular sciences* < złożona do druku 22 września 2020 r., a zaakceptowana do druku 16 października 2020 r. Czasopismo o impact factot 4,556. Podając te daty chciałem zwrócić uwagę na krótki czas jaki upłynął od złożenia pracy do jej przyjęcia do druku, co jest przywilejem jedynie prac o znacznym walorze naukowym i interesującym aktualnym tematem.

Ze względu na przytoczone w pracy dwie publikacje z udziałem współautorów, recenzujący zapoznał się z Dz. U. Z 2003 r. Nr 65, poz. 595, rozdział 2, art. 13 i z jego licznymi uzupełnieniami aż do 2017 r., w którym brzmi: *rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wskazuje ona indywidualny wkład kandydta, odpowiadający warunkom określonym w ustawie 1*. I właśnie indywidualny wkład doktorantki, jako pierwszego autora, został dokładnie opisany i zilustrowany w formularzu oświadczenia autorów o udziale w dołączonych publikacjach oraz własnoręcznie podpisany przez każdego współautora.

W związku z powyższym, skompikowane i żmudne zastosowane techniki badawcze – takie jak: elementarne metody pobierania i utrwalania tkanek (watroby i nerek), i przygotowywanie do szeregu oznaczeń różnymi technikami histologicznymi i techniką immunofluorescencji, pobieranie krwi osesków do badań ich morfologii, pomiar bilirubiny, zastosowanie techniki, metodą Real Time quantitative PCR, Western blot do oznaczenia haptoglobiny i hemopeksyny, oksygenazy hemowejw mysich osesków, spektrofotometryczne metoda oznaczania białek, wprowadzenie techniki Wetern blotting : w pełni usprawiedliwiają wprost niemożliwe wykonanie badań przez jedną osobę, ponadto zastosowanie tej wielorakiej

metodyki badań zapewniło druk prac w czasopismach o wysokiej renomie i znanych z ostrych, skrupulatnych recenzji.

Można określić, że duża część rozprawy podzielonej na 9 rozdziałów z licznymi podrozdziałami, szczególnie szeroko rozwinięty jest rozdział 4 podzielony na 5 podrozdziałów zawierających szczegółowy oparty na wzbogaconym o 50 pozycji (poza cytowanymi w publikacjach) najnowszego piśmiennictwa światowego dotyczącego roli i metabolizmu żelaza, wewnątrz i zewnątrz komórkowego, z szczególnym uwzględnieniem jego losu w nerkach myszy w życiu płosowym jak i zaraz po urodzeniu. I w tym miejscu zwracam uwagę, że tego typu szczegółowy przegląd wiedzy, napisany niezwykle jasno i dobrze zilustrowany, wprowadzający najnowsze informacje dotyczące metabolizmu żelaza i jego transporterów, winien być opublikowany w polskim czasopiśmie KOSMOS. Tak przedstawiony artykuł, będzie cennym źródłem informacji naukowej zwłaszcza dla studentów, magistrantów, a nawet doktorantów.

W dalszych 5 podrozdziałach w sposób zwięzły przedstawione są procesy hemolizy śródnaczyniowej i żółtaczkowej noworodkowej myszy i związanym z tym procesem (jednak fizjologicznym) metabolizmu żelaza i jego wtórnym wykorzystaniem przez ustrój osesków mysich w aspekcie porównawczym pomiędzy myszami o genotypie dzikim, a myszami z nokautem genu *Hmox1*, cechujące się brakiem lub osłabioną aktywnością oksygenazą hemowej. Podwyższoną śmiertelnością zarówno w życiu embionalnym jak i postnaalnym, wielonarządowym gromadzeniem żelaza niehemowego. Taki stan doprowadza do licznych uszkodzeń na poziomie komórkowym (makrofagi), jak i na poziomie narządów U myszy tych stwierdzono upośledzenie eksportu żelaza z komórek kanalików nerkowych do krwioobiegu na skutek obniżonej aktywności ferroportyny. Doktorantka zwraca uwagę, że niezbędne do rozwoju żelazo nie wraca do krwioobiegu, a ponadto zostaje odkładane w kanalikach nerkowych.

Niezwykle cennym osiągnięciem doktorntki, jak i całego zespołu przedstawionego w publikacjach, na podstawie szczegółowych jak i również skomplikowanych badaniach, po raz pierwszy u osesków mysich udowodniono wychwyt żelaza w ich nerkach Wychwytowi towarzyszy neutralizacja żelaza hemowego i niehemowego pochodzącego z hemolizy erytrocytów. W procesie tym zdaniem autorki, szczególną rolę pełni ferroportyna zwracająca żelazo do krwioobiegu. Ten oszczędny mechanizm wobec żelaza sprawia jego brak utraty z moczem i dalej podkreślono, że żelazo to konieczne jest nie tylko w życiu płodowym dostarczane do wątroby, gdzie głównie rozwija się linia erytroblastyczna – rodząca erytrocyty ale i postnatalnym przez kilkanaście dni po urodzeniu.

Po raz pierwszy opisano obecność transportera hemowego HRG 1 (heme responsive gene 1) w komórkach epitelialnych kanalików proksymalnych mysich nerek tuż po urodzeniu, co dowodzi o wychwycie z światłą kanalików wolnego hemu. Obniżeniu tego białka towarzyszy stopniowy spadek hemolizy. Jest to ważne odkrycie dotyczące ssaków, ponieważ przed laty podobne zjawisko spostrzeżono na modelowym przykładzie rybki akwariowej *Danio rerio*.

I jeszcze jedno ważne odkrycie dotyczyło badań myszy z nokautem genu *Hmax1*, u których występuje upośledzona recyrkulacja żelaza, anemia mikrocytarna, niski poziom żelaza w osoczu i wzrastający z wiekiem wzrost złogów żelaza w komórkach wątrobowych. Równolegle na zły rozwój tych myszy wpływa permanentny stan zapalny, objawiający się

aspłemią, lub splenomegalią, zapaleniem gruczołów limfatycznych, naciekami limfatycznymi w wątrobie i limfocytozą. Te spostrzeżenia zostały przytoczone na podstawie cytowanego piśmiennictwa i dotyczyły myszy dorosłych z tym genowym nokautem, ale jak doktorantka twierdzi odnośnie osesków z hemolizą noworodkową była to *terra incognita*. U 3 i 5 dniowych myszy *Hmox1*, ciała nerkowe jak i kanaliki nerkowe, w których jak wiemy zachodzi proces filtracji, są nie ukształtowane. U myszy tych stwierdzono hemolizę śródnaczyniową i zwiększony poziom żelaza w moczu, obniżony poziom ferropotyny, hormonu hepcydyny oraz nieaktywną oksydazę hemową.

Cały szereg badań, w których prowadzono analizę ilościową i jakościową takich elementów jak: oksydaza hemowa, ferropotyna, hepcydyna, kompleks megalina-kubulina, udział białka HRG1, związane z hemolizą noworodkową, jest cennym i nowym wkładem do nauki, dającym nowe spojrzenie w proces metabolizmu żelaza i hemu w nerkach.

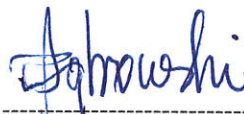
**Do prawie nieznaczących uchybień można wymienić:** brak spisu i wyjaśnień skrótów, używanie terminu handlowego „podaż”.

Przytaczając proces metabolizmu żelaza nie wspomniano o udziale askorbinianu – wyjątkowo syntetyzowanego u gryzoni w przeciwieństwie do naczelnych.

Na str. 66 „W obecnych badaniach zastosowano metodę histochemicznego barwienia na obecność żelaza w tkankach (barwienie Perla – prawidłowo Perls’a – tak użyto w publikacji), jednak nie udało się wykryć żelaza w nerkach noworodków, nawet w okresie wzmożonej hemolizy”. Metoda Perls’a jest metodą zgrubną i te ilości żelaza zwłaszcza w nabłonku kanalików nerkowych –jednak powinna być, co można udowodnić metodą Singer’ sa w technice ME. Ale to jest jedynie propozycja odnośnie dalszych badań.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki wytyczone w wyżej cytowanej ustawie, jak i również zaprezentowane wyniki badań wnoszące zupełnie nowe szczegóły związane z metabolizmem żelaza zwłaszcza w aspekcie hemolizy/żółtaczki niemowlęcej do nauki, składam wniosek do **Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego -**

1. O dopuszczeniu Pani mgr Aleksandry Bednarz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie : nauki biologiczne
2. O wyróżnieniu tej rozprawy mając na uwadze włożony trud w badaniach jak i cenne nowe odkrycia.



Zbigniew Dąbrowski