

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Iwony Cichoń pt: "Immunometabolizm tworzenia neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET)".

Neutrophils stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami działając poprzez proces fagocytozy, degranulacji ziarnistości oraz generacji wolnych rodników tlenowych i azotowych. W ostatnich latach opisano nowy mechanizm obronny granulocytów, zależny od tworzenia zewnątrzkomórkowych sieciopodobnych struktur złożonych ze zdekondensowanej chromatyny jądrowej oraz enzymów, nazwany *neutrophil extracellular traps (NETs)*. NETs jest kluczowym elementem odporności nieswoistej, ale także źródłem antygenów i czynników prozapalnych, dlatego nieprawidłowości w tworzeniu lub degradacji tej struktury są powiązane ze wzrostem podatności organizmu na zakażenia i choroby zapalne. Nie do końca poznane są jednakże mechanizmy molekularne tworzenia NETs oraz zależności pomiędzy tym zjawiskiem a procesami metabolicznymi i otyłością. Wybór tematu pracy ma więc istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiona praca opiera się zestawieniu 4 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych o łącznym IF 20,084. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem a jej udział w publikacjach wynosi 40 – 60%.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że procesy metaboliczne i otyłość mają wpływ na tworzenie i wyrzut NET zarówno *ex vivo* jak i *in vivo*.

We wstępie Doktorantka przedstawiła informacje dotyczące rozwoju, budowy i funkcji granulocytów ze szczególnym uwzględnieniem różnic pomiędzy neutrofilami mysimi a ludzkimi. Autorka przedstawiła budowę i funkcję sieci neutrofilowych oraz genezę ich powstawania, z uwzględnieniem poznanych elementów mechanizmu molekularnego. W końcowej części wstępu przedstawiona została rola neutrofilów oraz NETs w chorobach

zapalnych i metabolicznych oraz w zaburzeniach krzepnięcia. Szczegółowo omówione zostały również procesy metaboliczne (w tym proces glikolizy, szlaku pentozofosforanowego, cyklu Krebsa, przemian lipidowych oraz fosforylacji oksydacyjnej) w powiązaniu z coraz powszechniejszymi chorobami cywilizacyjnymi takimi jak otyłość i stan układu odpornościowego. We wstępie przedstawiony został również zwierzęcy model badawczy, w tym metoda wywoływania endotoksemii i posocznicy u myszy. Pozostałe techniki laboratoryjne stosowane w pracy, metody izolacji granulocytów krwi obwodowej, skóry oraz szpiku kostnego myszy, przebieg procesu stymulacji komórek ludzkich i mysich oraz wizualizacji sieci, metody fluorymetryczne, cytometryczne, western blot i ocena wybuchu tlenowego zostały przedstawione w poszczególnych publikacjach.

Wstęp dobrze uzasadniał genezę pracy doktorskiej. Praca doktorska jest częścią szeroko zakrojonych badań sieci granulocytarnych prowadzonych przez zespół Zakładu, z którego pochodzi Doktorantka.

Publikacja nr 1 “Imaging of Neutrophils and neutrophil Extracellular Traps (NETs) with Intravital (In Vivo) Microscopy.” *Methods Mol. Biol. Neutrophils: methods and protocols.*

Publikacja nr 1 stanowi wprowadzenie do całego cyklu prac, przedstawiając nowatorską, oryginalną metodę badawczą, którą posługiwano się podczas wszystkich eksperymentów prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. W publikacji opisano metodę przyżyciowego obrazowania sieci za pomocą mikroskopii. Przedstawiono również techniki mikrochirurgiczne przygotowujące mysz do obrazowania – kaniulację żyły szyjnej, przygotowanie wątroby, metodykę wizualizacji neutrofilii i wyrzucanych sieci w sinusoidach wątroby oraz otaczających struktur. Autorska technika umożliwiająca śledzenie w czasie rzeczywistym dynamicznego procesu sieciowania jest niezwykle wartościową metodą pozwalającą ocenić przebieg przyżyciowego tworzenia sieci oraz kolokalizację NETs z innymi składowymi jak MPO czy NE. Metoda ta zdecydowanie przewyższa techniki bazujące na ocenie statycznego, utrwalonego obrazu mikroskopowego. Technika przyżyciowego obrazowania NETs w zatokach wątroby stanowi istotny postęp w badaniach nad tą strukturą. Umożliwia dynamiczne obserwacje w czasie i eliminuje artefakty powstające w trakcie badań *in vitro*. Opracowanie tej metody jest wybitnym osiągnięciem Doktorantki.

Publikacja Nr 2 “Obesity paradox in sepsis”: obesity is accompanied by diminished formation of neutrophil extracellular traps (NETs) due to restricted neutrophil-platelet interaction.” *Cells.*

W publikacji zobrazowano i przeanalizowano tworzenie NETs w zatokach myszy szczupłych oraz z otyłością (uwarunkowaną genetycznie lub związaną z dietą wysokokaloryczną). Tworzenie sieci obserwowano w przebiegu endotoksemii lub posocznicy bakteryjnej. Doktorantka używa terminu sepsa choć poprawnym językowo terminem w języku polskim jest posocznica. Nie jest to jednak istotne uchybienie, gdyż termin „sepsa” jest obecnie szeroko stosowany zamiennie. Porównanie tworzenia sieci w przebiegu posocznicy u zwierząt szczupłych i otyłych jest oryginalnym aspektem pracy. Z drugiej jednak strony „paradoks otyłości” czyli obserwacja niektórych autorów, że śmiertelność u osób otyłych w przebiegu posocznicy jest niższa niż osób z prawidłową masą ciała, została w istotny sposób podważona w pandemii Covid-19. Posocznica w przebiegu tej choroby jest obarczona zdecydowanie wyższą śmiertelnością u osób otyłych niż w przypadku osób z prawidłowym BMI. Zatem „wieloośrodkowe badania” na wielomilionowej grupie chorych zdecydowanie podważyły hipotezę paradoksu otyłości. Paradoks otyłości może być artefaktem związanym z metodologią badań naukowych a nie szeroko potwierdzonym zjawiskiem.

Ważną obserwacją Doktorantki był fakt, że myszy otyłe bardzo słabo tworzą sieci, niezależnie od podłoża otyłości. Dodatkowo kinetyka tworzenia sieci zależała od BMI - proces sieciowania u myszy otyłych przebiegał zdecydowanie wolniej niż u szczupłych. Słabsze tworzenie sieci u myszy otyłych nie wynikało ze słabszej infiltracji docelowych narządów przez neutrofile. Eksperymenty *in vitro* wykazały także, że neutrofile myszy otyłych są zdolne do prawidłowego wyrzutu sieci, a słabsze tworzenie NETs *in vivo* wynika ze zmian w mikrośrodowisku. Kolejno Doktorantka stwierdziła, że stężenie NE u myszy otyłych jest podwyższone, co nie było powiązane z sieciowaniem i wynikało raczej z zaburzeń związanych z obecnością nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej w organizmie. Powiązanie pomiędzy NE a otyłością być może wynika z niedoboru jej inhibitora - alfa-1AT u zwierząt otyłych. Natomiast wzrost NE u myszy szczupłych wiązał się bezpośrednio z tworzeniem sieci co doktorantka potwierdziła w toku eksperymentu z inhibitorem NETs - CL-amidyną.

Stwierdzając niedostateczne tworzenie sieci u myszy otyłych Doktorantka poszukiwała mechanizmu tego zjawiska. Skoro udowodniono, że nie jest to defekt komórek a raczej mikrośrodowisko, Doktorantka próbowała powiązać defekt tworzenia sieci z odpowiedzią neutrofilów na egzogenną leptynę u zwierząt otyłych, u których poziom leptyny był pierwotnie podwyższony, w porównaniu do zwierząt z prawidłową masą ciała. Leptyna podana egzogennie nasilała wyrzut sieci ale tylko u myszy szczupłych. Jednak zniesienie działania endogennej leptyny nie wpływało na wyrzut sieci w żadnej z badanych grup. Przeprowadzane obserwacje sugerują występowanie leptynooporności u zwierząt otyłych. Mechanizm wiążący leptynę z

procesem formowania sieci nie został wyjaśniony i będzie z pewnością przedmiotem dalszych dociekań naukowych.

Kolejno badano wpływ osi IL-33 oraz CXCR2 na wybrane funkcje neutrofilów. IL33 jest cytokiną odpowiadającą za rekrutację neutrofilów poprzez regulację ekspresji receptora chemokinowego CXCR2. Blokada osi prowadziła do zablokowania wyrzutu sieci w warunkach fizjologicznych. Jednakże blokada CXCR2 nie zapobiegała akumulacji neutrofilów u myszy otyłych co pozwoliło doktorantce sformułować wniosek, że przyczyną niewrażliwości może być może desensytyzacja receptora. Doktorantka słusznie sugeruje jednak, że blokada CXCR2 nie jest odpowiedzialna za spadek formacji sieci u otyłych. Autorka sugeruje bardziej złożony mechanizm zależny także od produkcji innych chemokin (CXCL5) i ich wiązania zarówno z CXCR1 jak i CXCR2.

Bardzo ciekawą obserwacją było osłabienie interakcji pomiędzy płytkami krwi myszy otyłych a neutrofilami co było kolejną przyczyną upośledzenia wyrzutu sieci u myszy otyłych. Zjawisko to było częściowo odwracalne przez transfer płytek myszy szczupłych do otyłych. Za upośledzoną interakcję pomiędzy neutrofilami a płytkami odpowiadała nadekspresja P-selektyny u myszy otyłych. Po zastosowaniu blokady tej selektyny płytki myszy otyłych podane myszom szczupłym indukowały większy wyrzut sieci. Tropiąc patologie związane z otyłością doktorantka zauważyła, że wątroby u otyłych myszy prezentują zmiany patologiczne niezależnie od obecności zakażenia. Co ciekawe posocznica nie pogłębiała obserwowanych uszkodzeń tego narządu. W wątrobie otyłych zwierząt w przebiegu posocznicy obserwowano znacząco więcej agregatów płytek niż u myszy szczupłych. Zmniejszoną produkcję sieci w przebiegu posocznicy u otyłych zwierząt Doktorantka tłumaczy osłabieniem interakcji pomiędzy płytkami krwi a neutrofilami. Doskonale wykonana ikonografia ułatwia zrozumienie opisanych zjawisk i podkreśla brak wewnętrznego defektu neutrofilów u myszy otyłych. Konkluzją z przeprowadzonych eksperymentów jest sugestia, że w przebiegu posocznicy nadmiernie aktywowane płytki ulegają intensywnej agregacji i zostają uwięzione w zakrzepach, co uniemożliwia ich prawidłową interakcję z neutrofilami i osłabia wyrzut sieci. Transfer płytek od myszy szczupłych do otyłych, w wyniku którego uzyskano wzrost wyrzutu sieci u otyłych, potwierdza istnienie dysfunkcji płytek u myszy otyłych. Eksperyment z zastosowaniem przeciwciał neutralizujących działanie P selektyny na powierzchni płytek u zwierząt otyłych i transfer tak zmienionych płytek do myszy szczupłych zwiększył wyrzut sieci co potwierdza hipotezę o wpływie nadmiernej agregacji na osłabienie interakcji płytek z neutrofilami. Niezwykle interesująca jest postawiona na końcu hipoteza, że nadmierna agregacja płytek u otyłych jest czynnikiem pogarszającym rokowanie w przebiegu ciężkich zakażeń.

Publikacja nr 3 “Metabolic pathways involved in formation of spontaneous and LPS – induced neutrophil extracellular traps (NETs) differ in obesity and systemic inflammation.” Int. J. Mol. Sci.

W niniejszej publikacji ocenie poddano metabolizm neutrofilii myszy szczupłych i otyłych. Metabolizm oceniono po jednogodzinnej i sześciogodzinnej inkubacji komórek *ex vivo* z LPSEM. Wykorzystując system Seahorse, wykazano że glikoliza jest bardziej nasiloną u myszy szczupłych niż otyłych. U myszy septycznych spontaniczny wyrzut sieci był wyższy u myszy z prawidłową masą ciała niż u otyłych. Wyrzut sieci stymulowanych godziną inkubacją z LPS był również wyższy u myszy szczupłych, zarówno w warunkach podstawowych jak i w posocznicy. Po 6 h inkubacji z LPS myszy szczupłe w warunkach podstawowych wyrzucały mniej sieci niż otyłe natomiast w przebiegu posocznicy zarówno myszy szczupłe jak i otyłe produkowały porównywalne ilości NETs. Sytuacja ulega zmianie u myszy poddanych 24 godzinnej endotoksemii. Spontaniczny wyrzut NETs myszy otyłych w przebiegu endotoksemii znacząco wzrastał w porównaniu do myszy otyłych w warunkach podstawowych, natomiast po stymulacji „zmęczone” neutrofile niezdolne do dorzutu sieci po dodatkowej krótkiej stymulacji, odzyskują zdolności sieciowania po przedłużonej stymulacji LPSEM. Zrozumienie i prześledzenie całości złożonych układów doświadczalnych i otrzymanych wyników ułatwia bardzo przejrzysty rysunek.

Ważnym szlakiem metabolicznym w procesie tworzenia NETs, szczególnie u myszy z prawidłowym BMI, jest glikoliza i cykl pentozofosforanowy. Sieciowanie jest upośledzone przy braku podaży glukozy i blokadzie jej receptora GLUT1. Co ciekawe, po stymulacji LPSEM blokada receptora dla glukozy nie powodowała osłabienia wyrzutu sieci. Doktorantka słusznie wnioskuje, że w endotoksemii spadek metabolizmu węglowodanów może zostać skompensowany przez metabolizm wolnych kwasów tłuszczowych i energia jest pozyskiwana w innych źródłach. Oryginalną obserwacją Doktorantki jest fakt, że zablokowanie syntazy ATP nasila wyrzut NETs co jest tłumaczone metaboliczną kompensacją możliwą przy braku wewnętrznego defektu neutrofilów u zwierząt otyłych.

Podsumowując publikacja przedstawia bardzo złożone zależności pomiędzy ścieżkami metabolicznymi, produkcją energii a tworzeniem sieci za równo u zwierząt z prawidłową masą ciała jak i otyłych, zarówno w warunkach zdrowia jak i przy potężnej stymulacji układu odpornościowego jaką jest endotoksemia i posocznica. Komórki poddane ekstremalnym bodźcom zachowują się w zróżnicowany sposób co leży u podłoża złożonej odpowiedzi zapalnej prowadzącej bądź do zwalczania zagrożenia bądź do śmierci organizmu. Przeprowadzone eksperymenty mają ogromne znaczenie dla poznania tych niezwykle istotnych

zagadnień i odpowiedzi na pytania powstające w głowach klinicystów i naukowców na całym świecie w związku z pandemią.

Publikacja nr 4 "Reduced neutrophil extracellular trap (NET) formation during systemic inflammation in mice with Menkes disease and Wilson disease: copper requirements for NET release." *Front Immunol*.

W pracy wykazano, że zarówno myszy z niedoborem jak i nadmiarem miedzi w organizmie produkują mniej sieci w porównaniu do myszy dzikich. W przeprowadzonych eksperymentach oceniono ekspresję białek transportujących miedź na neutrofilach szpiku kostnego myszy. Obserwowano również że niedoborowi miedzi towarzyszy mniejsza infiltracja zatok wątroby neutrofilami, natomiast w przeładunku tym pierwiastkiem naciek neutrofilów jest intensywny a neutrofile są pochłaniane przez makrofagi wątrobowe. Wyniki pracy wpisują się w powszechnie uznany pogląd, że mikrośrodowisko i mikroelementy są istotne w procesie tworzenia sieci. Warto zauważyć jednak, że zaburzenia przemiany miedzi w obu tych modelach pociągają za sobą bardzo głębokie zaburzenia funkcjonowania wielu narządów i tkanek. Zatem zaburzenia tworzenia sieci przez granulocyty mogą wynikać nie tylko bezpośrednio z niedoboru/nadmiaru miedzi ale pośrednio być wypadkową głębokich defektów działania wielu układów, z którymi układ immunologiczny jest powiązany. Dla większej wyrazistości wyciąganych wniosków warto prowadzone eksperymenty powtórzyć u zdrowych myszy pozostającej na diecie z wysoką zawartością tego pierwiastka lub pozbawionej miedzi.

W zwięzłym rozdziale dyskusja Autorka ustosunkowała się do otrzymanych wyników w świetle doniesień innych autorów. Autorka podkreśla złożoność mechanizmów regulacyjnych i zależności pomiędzy procesami metabolicznymi, otyłością a wyrzutem sieci.

W dyskusji Doktorantka powołuje się na inne prace swojego zespołu. Pracę kończy krótkie podsumowanie połączone z wnioskami. Wyniki pracy są niezwykle cenne i ciekawe, jednakże ze względu na ogromną liczbę powiązanych ze sobą obserwacji i zależności warto by było o ich syntetyczne zebranie w postaci łatwej do przestudiowania listy lub formie graficznej.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Zaprezentowana praca jest odpowiedzią na logiczny ciąg zadawanych pytań dotyczących badanego zagadnienia oraz pytań pojawiających się stopniowo podczas realizacji eksperymentów badawczych. Niewątpliwie praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki i stanowi istotny wkład do nauki. Przedstawiona praca jest dowodem pracowitości,

umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Świadczy o zdolności do samodzielnego rozwiązywania postawionych sobie celów badawczych, o umiejętności krytycznej interpretacji wyników badań na tle właściwie wykorzystanego piśmiennictwa naukowego oraz logicznego wnioskowania. Przedstawiona do oceny rozprawa niewątpliwie zachęca do kontynuowania badań dotyczących opisywanych problemów. Do najbardziej istotnych osiągnięć Doktorantki zaliczam właściwe powiązanie zagadnień doświadczalnych będących przedmiotem pracy z szerszym kontekstem poznawczym i klinicznym, a w szczególności ze złożonym obrazem procesów patofizjologicznych charakterystycznych dla odpowiedzi nieswoistej i ciężkich zakażeń. Warte podkreślenia jest również nowatorstwo i oryginalność pracy, gdyż badania dotyczące powyższych zagadnień są bardzo nieliczne. Wyniki pracy warte są szerokiego rozpowszechnienia w środowisku naukowym. Przedstawiona do oceny praca doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia.

W oparciu o przedstawioną analizę stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Iwony Cichoń pt: "Immunometabolizm tworzenia neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET)" spełnia kryteria uprawniające do nadania stopnia doktora w obszarze nauk biologicznych. Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Iwony Cichoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii praca pozwoliła na istotne pogłębienie istniejącej wiedzy o genezie tworzenia sieci i jej powiązaniu ze zjawiskami fizjologicznymi i patologicznymi, dlatego zwracam się także z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

