

Białystok, 2022-09-01

Recenzja pracy doktorskiej mgr Michała Santockiego

na temat

„Fizjologiczne mechanizmy usuwania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET) przez leukocyty myszy w przebiegu ogólnoustrojowego zapalenia”

Dzięki odkrytym na początku tego stulecia zdolnościom neutrofilów do generowania zewnątrzkomórkowych sieci (NETs) nastąpił przełom w poglądach na temat biologii tych komórek. Zjawisko to występuje w warunkach fizjologii i pełni istotne funkcje obronne związane z eliminacją czynników patogennych. Wiele doniesień w ostatnich latach wskazuje także na niekorzystną rolę tych struktur. Wykazano bowiem, że z różną intensywnością występują one w przebiegu procesów zapalnych, autoimmunizacyjnych czy nowotworowych, uczestnicząc w ich patomechanizmie. Spowodowało to szerokie zainteresowanie tymi zagadnieniami wielu ośrodków badawczych na świecie, w tym także zespołu Pani Prof. Elżbiety Kołaczekowskiej, kierownika Pracowni Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Biorąc pod uwagę następstwa wynikające z długotrwałej obecności NETs w organizmie, mgr Michał Santocki podjął temat dotyczący eliminacji tych struktur w badaniach eksperymentalnych na myszach w przebiegu ogólnoustrojowego zapalenia wywołanego podaniem lipopolisacharydu (LPS).

W obszernym, bardzo interesującym i pięknie zilustrowanym wstępie Doktorant dokonał krytycznej analizy dotychczasowych wyników badań na temat przyczyn formowania sieci NETs, ich funkcji oraz mechanizmów odpowiedzialnych za usuwanie tych struktur. Na podkreślenie zasługuje wnikliwy i jednocześnie czytelny schemat, opracowany przez Autora, w którym przedstawił dotychczasowe odkrycia związane z usuwaniem NETs. Ważne też jest, z punktu widzenia tematu pracy, omówienie receptorów i wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych zaangażowanych w rozpoznawanie sieci.

Większość dotychczasowych badań nad sieciami NETs, jak podkreśla Doktorant, prowadzono w warunkach *ex vivo*, co nie pozwala w pełni ocenić zjawisk związanych z ich biologią.

W związku z powyższym, Doktorant postanowił zbadać powstawanie i usuwanie NETs w warunkach *in vivo*. W tym celu stworzył własny, oryginalny model eksperymentalny u myszy, dzięki czemu mógł śledzić zachowanie sieci bezpośrednio w mikrośrodkowisku organizmu, co stanowi nowatorski charakter przeprowadzonych badań.

Na podstawie danych zawartych we wstępie Doktorant sformułował oryginalną hipotezę badawczą i przedstawił obszerną listę szczegółowych celów do jej weryfikacji.

Podkreślić należy precyzyjnie opisaną część metodyczną, wzbogaconą licznymi schematami i znakomitej jakości zdjęciami, co pozwala dokładnie prześledzić poszczególne etapy prowadzonych badań.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorant opracował nowatorską metodę wizualizacji i pomiaru objętości białek NETs wewnątrz komórek w warunkach *in vivo* oraz metodę obrazowania techniką mikroskopii *in vivo* w dwóch wymiarach – 2D. Ponadto, dzięki zastosowaniu mikroskopu konfokalnego mógł dokonać obrazowania nawet w trzech wymiarach – 3D. Dzięki wykorzystaniu oprogramowania do wieloparametrowej analizy obrazu i opcji półprzezroczystości (IMARIS) był w stanie dokładnie zlokalizować badane białka NETs – elastazę neutrofilową (NE) oraz histony H2A.X.

Przedstawienie, zwłaszcza w formie graficznej oraz opis uzyskanych przez Doktoranta wyników zasługują na wyróżnienie, obejmują bowiem jednocześnie ich analizę i interpretację, co pozwoliło nadawać kierunek kolejnym etapom badań, które były konsekwentnie realizowane.

Bardzo interesujące wyniki uzyskał Doktorant badając kinetykę formowania i usuwania sieci NETs oraz liczby neutrofilów stosując technikę mikroskopii przyżyciowej.

Większość dotychczasowych badań nad tworzeniem i eliminacją NETs była prowadzona w początkowych godzinach zapalenia, w czasie nie dłuższym niż 24 godziny. Skłoniło to Doktoranta do obserwacji kinetyki powstawania i eliminacji NETs w szerszym przedziale czasowym, sięgającym 365 dni.

Prowadząc badania w 2 godzinie od wywołania sepsy stwierdził jednoczesny, istotny wzrost poziomu ocenianych składowych sieci: NE, histonów H2A.X i neutrofilów w sinusoidach wątroby, a na ich powierzchni extDNA, które osiągały najwyższe wartości w 8 godzinie, po czym następowało ich obniżenie. Szczególnie istotną obserwacją było wykazanie ponownego wzrostu poziomu wszystkich tych parametrów w 14 dobie od wywołania zapalenia, a następnie ich powolny, długotrwały spadek osiągający wartości obserwowane u myszy kontrolnych w 365 dni od wywołania sepsy.

Odmiennej dynamikę zmian wykazał Doktorant w zakresie aktywności NE, stosując sondę fluorescencyjną podawaną dożylnie, która emituje sygnał jedynie w obecności aktywnego enzymu. Interesujące jest, że jej aktywność utrzymywała się na wysokim poziomie aż do 160 dnia zapalenia, kiedy to osiągnęła wartości obserwowane u myszy kontrolnych.

Badając zachowanie się cytokin zapalnych, podobną do elementów sieci kinetykę zmian Doktorant zaobserwował tylko w przypadku IL-1 β oraz liczby neutrofilów. Pozostałe mediatory IL-6, TNF- α , MCP-1 oraz IL-10 osiągały najwyższe wartości w 2 godzinie od wywołania sepsy, a następnie ulegały obniżeniu do poziomu grupy kontrolnej w różnym czasie, od 6 do 24 godzin, a w przypadku IL-10 - w 10 dobie. Wyjątek stanowił IFN- γ , który najwyższy poziom osiągnął w 6 godzinie i niski w 24 godzinie.

Wyniki uzyskane w 24 godzinie od wywołania sepsy wskazują, że część białek sieci NETs uległo fagocytozie i znajduje się w makrofagach, a także neutrofilach, część na zewnątrz komórek, a część jest w trakcie pochłaniania. Potwierdził, co zasługuje na podkreślenie, specyficzność zastosowanego barwienia i pochłaniania NE i histonów H2A.X przez makrofagi i neutrofile przy użyciu przeciwciał izotypowych i przeciwciał blokujących receptor FcR. Stworzenie specjalistycznej maski pozwoliło wyodrębnić białka obecne w fagocytach i dokonać pomiaru ich objętości przy użyciu specjalnego modułu Measurement PRO. Dzięki temu Doktorant wykazał, po raz pierwszy, że cząsteczkom elastazy neutrofilowej (NE) towarzyszyły cząsteczki histonów H2A.X. Wykazał także, że makrofagi w większym stopniu niż neutrofile wykorzystują proces immunofagocytozy w eliminacji NETs.

Eksperyment z usunięciem makrofagów wątroby w 48 godzinie od wywołania sepsy prowadził do śmierci zwierząt, spowodowanej według Doktoranta i innych autorów, obniżoną produkcją anty-zapalnej IL-10, której głównym źródłem są makrofagi i monocyty. Obserwowany efekt, może być następstwem braku IFN- γ indukowanego przez IL-10, a jak udowodniono, IFN- γ silnie aktywuje monocyty i makrofagi w przebiegu sepsy.

Badając różne grupy komórek, potencjalnie zdolnych do eliminacji sieci NETs, Doktorant ocenił także udział eozynofiliów w tym procesie. Uzyskane wyniki nie wykazały istotnej roli tych komórek w klirensie NETs, natomiast ich brak był związany z przejściowymi zmianami w liczbie neutrofilów.

Podejmując próbę wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za usuwanie NETs w przebiegu sepsy, Doktorant zbadał zaangażowanie receptorów rozpoznających wzorce

molekularne (PRRs) należących do receptorów Toll-podobnych (TLRs) oraz receptorów zmiataczy klasy A (SR-A), zjawiska fagocytozy i DNazy I, przy użyciu odpowiednich inhibitorów.

Uzyskane wyniki wskazują, że blokada fagocytozy prowadziła do zmniejszenia pochłaniania NE i H2A.X przez makrofagi i neutrofile. Podobnie, blokada receptorów SR-A i TLR4 przez specyficzne przeciwciała skutkowała obniżeniem objętości pochłanianych NE i H2A.X przez obie grupy komórek. Natomiast hamowanie DNazy I dawało w efekcie jedynie zmniejszenie objętości pochłanianych histonów H2A.X przez makrofagi, co wskazuje na jej ograniczoną rolę w eliminacji NETs. W oparciu o tę obserwację, Doktorant sugeruje możliwość udziału innych DNaz w tym procesie, np. DNazy γ . Podobnie, ograniczona funkcja w usuwaniu NETs wydaje się dotyczyć receptora TLR2, którego blokada powodowała tylko obniżenie objętości NE w makrofagach i neutrofilach.

Szczególnie istotną obserwacją dokonaną w toku prowadzonych badań było wykrycie ponownego formowania sieci NETs w 14 dniu od wywołania sepsy, identyfikowanego w oparciu o silny sygnał z elementów NETs na powierzchni sinusoid. Skłoniło to Doktoranta do poznania punktu czasowego, w którym dochodzi do wzrostu poziomu składowych sieci. Wykazał, że punktem krytycznym był przełom 13 i 14 dnia, w którym obserwowano wyższe poziomy NE, histonów H2A.X, extDNA, a także wzrost liczby neutrofilów.

Badając wydarzenia w mikrośrodowisku wątroby, poprzedzające nasilone formowanie sieci w 14 dobie wykrył m.in. zwiększoną obecność i aktywność płytek krwi na powierzchni sinusoid na przełomie 13 i 14 dnia. Stwierdził także wzrost liczby komórek Browicza-Kupfera z markerem F4/80 i receptorem dla chemokiny CX3CL1 (CX3CR1), który obniżał się istotnie 14 dnia. Oznaczając stężenie chemokiny CX3CL1 w osoczu oraz jej ekspresję, a także ekspresję cząsteczek adhezyjnych PECAM-1, ICAM-1 i VICAM-1 na powierzchni sinusoid wykazał podobny do pozostałych parametrów, kierunek zmian.

Ważną rolę w kontroli zarówno liczby komórek Browicza-Kupfera, jak i formowania sieci NETs Doktorant przypisuje działaniu chemokiny CX3CL1, której blokada powodowała obniżenie liczby tych komórek oraz prowadziła do hamowania tworzenia NETs. Wskazuje również na istotne znaczenie jednoczesnego działania proteazy ADAMTS13 i DNazy I w regulacji NETs.

W oparciu o dokonane obserwacje, Doktorant podkreśla istotne znaczenie wydłużonej obecności komponentów NETs w wątrobie, które mogą wykazywać działanie prozapalne, a także immunomodulujące, prowadzące m.in. do aktywacji różnych proenzymów w krążeniu, np. proteazy aktywującej czynnik VII (FSAP). Udowadnia stymulującą rolę

FSAP w generowaniu sieci, na podstawie jej blokady, prowadzącej do zahamowania formowania tych struktur w 14 dniu od wywołania sepsy.

Najbardziej interesującą i cenną częścią rozprawy mgr Michała Santockiego jest z pewnością dyskusja, w której wnikliwie analizuje uzyskane wyniki własne w kontekście dotychczasowych osiągnięć w zakresie eliminacji sieci NETs. Autor nie uniknął powtórzeń, ale z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań i bardzo wnikliwych analiz, wydaje się to uzasadnione.

Pracę podsumowuje 7 wniosków, opartych na własnych obserwacjach Doktoranta. Za najważniejsze osiągnięcie uważam odkrycia dotyczące mechanizmów odpowiedzialnych za ponowny wyrzut sieci NETs w 14 dobie od wywołania sepsy, przedstawione we wniosku 7.

Mam uwagę dotyczącą wniosku 2, jego druga część wydaje się zbędna oraz wniosku 5, który uogólnia rolę poszczególnych receptorów rozpoznających NETs, chociaż jak wykazał sam Doktorant, receptory TLRs wykazują różne zaangażowanie w tym procesie.

Pozwalam sobie zwrócić też uwagę na sformułowanie „Fizjologiczne mechanizmy...” w tytule rozprawy, która dotyczy patologii - sepsy. Ponadto, forma skrótu nazwy sieci NETs wydaje się bardziej poprawna, niż NET.

Nieprawidłowe jest także nazewnictwo testu t-Studenta, który w pracy określany jest jako test T-studenta. Poza tym, interpunkcja pozostawia wiele do życzenia.

Te uwagi nie wpływają jednak na moją ogólną opinię na temat rozprawy, którą oceniam **bardzo wysoko**. Uważam rozprawę mgr Michała Santockiego na temat „**Fizjologiczne mechanizmy usuwania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET) przez leukocyty myszy w przebiegu ogólnoustrojowego zapalenia**” za niezwykle cenną, wnoszącą oryginalny wkład do wiedzy na temat powstawania i eliminacji sieci NETs w przebiegu sepsy. Podkreślić należy szeroką wiedzę Doktoranta w zakresie biologii sieci NETs, znakomitą umiejętność planowania i realizacji badań z wykorzystaniem najbardziej nowoczesnych technik badawczych.

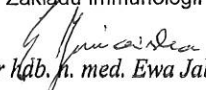
Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr Michała Santockiego spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455).

Z pełnym przekonaniem składam do **Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego** wniosek o dopuszczenie **mgr Michała Santockiego**

do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Biorąc pod uwagę wybitne osiągnięcia Doktoranta w zakresie badań nad mechanizmami eliminacji sieci NETs w przebiegu sepsy **wnioskuje o wyróżnienie rozprawy**, która ma nie tylko charakter poznawczy, ale stanowi punkt wyjścia do badań u ludzi, które mogą być przydatne w opracowaniu nowych, potencjalnych metod terapii ogólnoustrojowego zapalenia.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii


prof. dr hab. n. med. Ewa Jabłońska