



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Olchawy pt.

**„The effect of oxidative stress on phagocytic activity of
retinal pigment epithelium cells *in vitro*”**

Badania zespołu Prof. Sarny od szeregu lat dotyczą biofizyki komórek upigmentowanego nabłonka siatkówki i konsekwentnie poszerzają możliwości zrozumienia mechanizmów patogenezы zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (ARMD), choroby bardzo istotnej w skali społecznej. Jest ona bowiem główną przyczyną utraty wzroku przez osoby starsze w społeczeństwach uprzemysłowionych, a skala jej występowania rośnie w miarę zwiększania się długości życia. Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Olchawy podsumowuje kolejny, znaczący etap tych badań.

Rozprawa, napisana w języku angielskim, ma typowy układ. Otwiera ją , po krótkim *Ogólnym Wstępie (General Introduction)* kompetentnie napisany *Przegląd Piśmiennictwa (Bibliographic Studies)* *Wprowadzenie (Introduction)*, w którym Doktorantka przedstawia organizację funkcjonalną siatkówki, złuszczenie zewnętrznych segmentów komórek fotoreceptorowych i ich fagocytozę przez komórki nabłonka pigmentowanego siatkówki, źródła i tarcze stresu oksydacyjnego w komórkach nabłonka pigmentowanego siatkówki, zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem i główne mechanizmy ochrony nabłonka upigmentowanego siatkówki przed uszkodzeniem oksydacyjnym – karotenoidy i witaminę E. Szczególne moje uznanie wzbudza podrozdział poświęcony dyskusji komórek ARPE-19 jako modelu *in vitro* nabłonka pigmentowanego siatkówki człowieka – jego charakterystyce i ograniczeniom.

Fagocytoza złuszczanych zewnętrznych segmentów komórek fotoreceptorowych przez komórki nabłonka pigmentowanego siatkówki ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania siatkówki. Można przypuszczać, że jej zaburzenia prowadzą do degeneracji

siatkówki. W myśl hipotezy badawczej sformułowanej w rozprawie, powodem zachodzącego w toku starzenia się organizmu obniżenia zdolności komórek nabłonka pigmentowanego siatkówki do fagocytozy może być stres oksydacyjny.

Celem badań podsumowanych w rozprawie było uzyskanie informacji o roli stresu oksydacyjnego w upośledzeniu tej zdolności oraz o możliwości przeciwdziałania temu efektowi przez istotne dla siatkówki antyoksydanty – zeaksantynę i witaminę A. Zadania badawcze obejmowały (i) opracowanie modelu komórkowego *in vitro* dla badania podprogowego stresu oksydacyjnego na specyficzną i niespecyficzną aktywność fagocytarną komórek nabłonka pigmentowanego siatkówki, (ii) zbadanie, czy podprogowe uszkodzenie fotodynamiczne komórek ARPE-19 hamuje te aktywności, (iii) stwierdzenie, czy stopień hamowania aktywności fagocytarnej koreluje z zakresem i typem fotodynamicznego uszkodzenia lipidów tych komórek, (iv) określenie, czy zahamowanie specyficznego aktywności fagocytarnej komórek ARPE-19 jest związane z obniżeniem poziomu integryn $\alpha\beta 5$ i MerTK oraz (v) określenie możliwości modyfikacji efektów badanych w zadaniach (ii)-(iv) przez zeaksantynę i witaminę E.

Materiały i metody przedstawione są w rozprawie należycie szczegółowo. Stosowane metody obejmowały m. in. prowadzenie hodowli pierwotnych komórek nabłonka pigmentowanego siatkówki z oczu człowieka, izolowanie zewnętrznych segmentów komórek fotoreceptorowych z oczu krowy i ich znakowanie izotiocyanianem fluoresceiny, poddawanie komórek ARPE-19 działaniu stresu fotodynamicznego, pomiar przeżywalności komórek z MTT, błękitem trypanu i jodkiem propidyny, określenie lokalizacji stosowanych barwników inicjujących uszkodzenie fotodynamiczne oraz N-kadheryny, białka ZO-1 i F-aktyny w komórkach, oznaczenie fagocytozy z użyciem cytometru przepływowego, analizę poziomu białek receptorowych wobec zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, aktyny, katalazy i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, analizę heterodimeru $\alpha\beta 5$ techniką immunoprecypitacji i analizę poziomu wodoronadtlenków cholesterolu techniką HPLC z detekcją elektrochemiczną. Podoba mi się zastosowana pomysłowa metoda oceny aktywności fagocytarnej, oparta na pomiarze fluorescencji pochłoniętych, znakowanych fluorescencyjnie cząstek lateksu i zewnętrznych segmentów komórek fotoreceptorowych. Można się zastanawiać,

czy możliwa byłaby (pół)ilościowa standaryzacja metody, która pozwoliłaby ocenić liczbę wchłoniętych przez komórki cząstek.

Wysoko oceniam również właściwe zaplanowanie i logiczne przedstawienie *Wyników* badań. Jako obiekt badań posłużyły komórki ARPE-19. Doktorantka wybrała warunki poddawania ich stresowi oksydacyjnemu generowanemu poprzez efekt fotodynamiczny merocyjaniny 450 i różu bengalskiego, badając wpływ szeregu stężeń tych barwników na przeżywalność komórek w standardowych warunkach naświetlania, analizując efekty po ½ godziny i 24 godzinach od ekspozycji. Taki schemat doświadczeń pozwolił na oszacowanie odwracalności indukowanych zmian i jest w moim przekonaniu właściwy, jakkolwiek nieco brakuje mi doświadczenia przedstawiającego bardziej rozbudowaną analizę dynamiki czasowej zmian któregoś z parametrów badanych po tych dwu czasach, przekonującej, że czasy analizy zostały optymalnie dobrane.

Uzyskane wyniki dowodzą, że stres oksydacyjny indukowany w komórkach ARPE-19 przez efekt fotodynamiczny, powoduje hamowanie zarówno niespecyficznej, jak i specyficznej aktywności fagocytarnej, przy czym o ile w przypadku fagocytozy specyficznej efekty działania merocyjaniny 540 i różu bengalskiego w wybranych zakresach stężeń są porównywalne, o tyle hamowanie niespecyficznej aktywności fagocytarnej jest znacznie silniejsze w przypadku merocyjaniny 540. Zahamowanie aktywności fagocytarnej ma charakter przejściowy, i jest znacznie silniejsze po 30 minutach niż po 24 godzinach od ekspozycji na światło. Doktorantka wykazała też m. in., że stres oksydacyjny powoduje obniżenie poziomu białek MerTK, αv i $\beta 5$ oraz aktywności i zwiększa poziom wodoronadtlenków cholesterolu (5α -OOH i $7\alpha/\beta$ -OOH). Antyoksydanty (zeaksantyna i witamina E) znacznie zmniejszały wytwarzanie wodoronadtlenków cholesterolu, w mniejszym stopniu chroniły komórki przed utratą specyficznej aktywności fagocytarnej i słabo wpływały na efekt obniżenia poziomu białek MerTK, αv i $\beta 5$. Te efekty antyoksydantów wydają się być związane z ich lokalizacją w lipidowych obszarach błon komórkowych.

W dobrej, obszernej (18-stronicowej) dojrzałej *Dyskusji* Autorka rozprawy krytycznie analizuje uzyskane wyniki na tle danych piśmiennictwa. M. in. obszernie dyskutuje celowość

stosowania wybranego modelu wytwarzania stresu oksydacyjnego przez efekt fotodynamiczny, przytaczając szereg argumentów na rzecz tezy, że jest on lepszy w porównaniu z często stosowanymi stosowanym użyciem nadtlenu wodoru czy nadtlenków organicznym. Podzielam zdanie Autorki rozprawy, szczególnie w odniesieniu do komórek siatkówki. Nasuwa mi się przy tej okazji refleksja, że wybuch oddechowy, który – jak wszystko na to wskazuje – towarzyszy fagocytozie zewnętrznych segmentów komórek fotoreceptorowych przez pigmentowane komórki nabłonka siatkówki - wydaje się w tym przypadku nie mieć sensu biologicznego i być jedynie utrzymaniem uniwersalnego mechanizmu fizjologicznego. Chociaż – może jest jednak przydatny w przypadkach infekcji siatkówki?

Rozprawę zamyka podsumowanie *Kluczowych Wyników i Głównych Wniosków*, *Streszczenie* i należycie obszerne piśmiennictwo (301 pozycji).

Rozprawa jest świetnie napisana i bardzo mi się podoba. Funkcja recenzenta obliguje mnie jednak do kilku uwag krytycznych czy polemicznych. Do zastanowienia skłania użyte pojęcie „podprogowego stresu oksydacyjnego”. Autorka rozprawy stosowała takie warunki stresu oksydacyjnego, który powodował obniżenie przeżywalności komórek do nie mniej niż 90% po 30 minutach i nie mniej niż 85% po 24 godzinach. Takie obniżenie przeżywalności jest istotnie niewielkie, nie wiemy z lektury rozprawy, czy jest statystycznie istotne. Czy jednak mamy prawo nazywać taki stres oksydacyjny podprogowym?

Problemem, z jakim zetknęła się Doktorantka, jest kwestia standaryzacji wyników techniki Western blotting. Zazwyczaj wyniki densytometrii badanych białek są standaryzowane względem białka odnośnikowego, np. aktyny. Nie było to z pewnością możliwe w tych badaniach, w których poziom aktyny też ulegał zmianie. Autorka rozprawy nie poświęca zbyt wiele uwagi temu problemowi, wspominając jedynie o ładowaniu równoważnych objętości/ilości białka (s. 60), co nie jest w pełni jednoznaczne.

Warunki wzbogacenia komórek w antyoksydanty zostały podane w sposób w pełni szczegółowy, jednak ideałem byłoby oznaczenie poziomu antyoksydantów w komórkach.

Wydaje mi się, że przekształcenie wolnych rodników lipidów w wodoronadtlenki (co sprowadza się do dołączenia do cząsteczki lipidu cząsteczki tlenu) niekoniecznie jest procesem

redukcji (s. 41).

Drobiazg z Wykazu skrótów(s. 9): EDTA i EGTA jako skróty dla soli sodowej EDTA i kwasu (EGTA) - warto byłoby albo zróżnicować kwas i sól albo pominąć kationy sodowe, niekoniecznie istotne dla efektu EDTA.

Te marginalne uwagi nie rzutują na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Olchawy, którą uważam za istotne osiągnięcie naukowe Doktorantki i Jej Promotora. Chcę także zwrócić uwagę na bardzo staranną edycję rozprawy i na fakt, że wyniki uzyskane w pracy zostały opublikowane, jak dotychczas, w postaci dwóch artykułów w czasopismach *Photochemistry and Photobiology* oraz *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r, z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysockiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Magdaleny Olchawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, dnia 30 sierpnia 2013


Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz