



nencki institute
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK
**INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. M. NENCKIEGO**

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Tel. (0 22) 589 22 61; Fax. (0 22) 822 53 42

E-mail: adobrzyn@nencki.gov.pl; <http://www.team.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Pracownia Sygnałów Komórkowych
i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Warszawa 7.02.2016

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr. Witolda Nowaka

pt. „Influence of oxidative stress on bone marrow cells – characterization of mesenchymal stromal cells lacking *Hmox1*”

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Józkowicz i wykonana w Zakładzie Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w nurt badań nad molekularnymi mechanizmami patogenezы rozwoju dysfunkcji śródbłónka naczyniowego w obrębie kończyn, jako powikłań cukrzycy typu 2 (tzw. stopy cukrzycowej), i dotyczy określenia roli proangiogennych komórek macierzystych w tym procesie. Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że jednym z kluczowych białek warunkujących zachowanie żywotności i funkcji komórek śródbłónka i proangiogennych komórek szpikowych jest oksygenaza hemowa-1. Stąd, głównym celem ocenianej pracy było określenie wpływu czynników stresowych takich jak stres oksydacyjny, hiperglikemia, chroniczne powikłania cukrzycy typu 2 oraz wysiłek fizyczny u pacjentów z chromaniem przestankowym na mobilizację i funkcję subpopulacji proangiogennych komórek szpikowych oraz określenie roli oksygenazy hemowej-1 w tym procesie. Zarówno wybór tematu pracy, jak i zakres przeprowadzonych badań są, w mojej ocenie, w pełni uzasadnione i stanowią odpowiedź na wyzwania aktualnie stojące przed naukami biomedycznymi.

Praca napisana jest w języku angielskim, liczy 132 strony i została podzielona na następujące części: 1) Streszczenie w języku polskim i angielskim (7 stron), 2) Wstęp (17 stron), 3) Cel prowadzonych badań (1 strona), 4) Materiały i Metody (19 stron), 5) Wyniki (44 strony), 6) Dyskusja (16 stron), 7) Podsumowanie i wnioski (1,5 strony), 8) Bibliografia (16 stron).

Szkoda, że Doktorant nie umieścił w rozprawie rozdziału zawierającego spis stosowanych skrótów, ponieważ to bardzo ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie pracy, tym bardziej, że wprowadzane skróty stosowane są w tekście niekonsekwentnie. Poza brakiem zestawu zastosowanych skrótów, układ pracy jest właściwy i typowy dla dysertacji doktorskiej.

Wstęp pracy stanowi przegląd dotychczasowej wiedzy na temat potencjału jaki mają komórki macierzyste i progenitorowe w diagnostyce i leczeniu cukrzycy typu 2 (T2D). Znajdują się tu informacje dotyczące T2D i jej powikłań, przedstawiono także dokładną charakterystykę krążących komórek proangiogennych oraz mezenchymalnych komórek zrębu a także oksygenazy hemowej. Przedstawiono również najnowsze dane na temat wpływu cukrzycy i wysiłku fizycznego na frakcję krążących komórek proangiogennych oraz wpływu oksygenazy hemowej i statyn na krążące komórki angiogenne oraz mezenchymalne komórki zrębu. Ta część rozprawy opatrzona jest 4 rycinami, które dobrze opisują omawiane zagadnienia. Tak przygotowany wstęp stanowi właściwe wprowadzenie i uzasadnienie problematyki badawczej podjętej w ocenianej pracy doktorskiej i wskazuje na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Szeroka wiedza Doktoranta w zakresie tematyki pracy doktorskiej znalazła również swój wyraz w dwóch współautorskich pracach (w których Doktorant jest 1. autorem) opublikowanych w czasopismach *Thrombosis and Haemostasis* (2012) oraz *Journal of Diabetes Investigation* (2014). Jedyna moja uwaga dotyczy umieszczenia ryciny nr 1 zbyt daleko w tekście: rycina ta cytowana jest po raz pierwszy na str. 16, a umieszczona jest dopiero na stronie 21. Poza tym, podrozdział przedstawiający charakterystykę T2D mógłby być rozszerzony o mechanizmy patogenezy tej choroby oraz jej powikłań, co istotnie wzbogaciłoby pracę.

Cel i zakres pracy zostały jasno sformułowane. Są one zgodne z tematem pracy i nie ma wątpliwości, że ich realizacja pozwoliła na zweryfikowanie hipotez badawczych postawionych przez Autora. Warto podkreślić jest także to, że mgr Witold Nowak w swojej pracy wykorzystał zarówno modele zwierzęce (myszy z nokautem receptora leptyny db/db (model cukrzycy typu 2), myszy z nokautem genu *Hmox1* oraz myszy kontrolne typu dzikiego), jak i ludzkie komórki krwi pobrane od (1) pacjentów z T2D bez powikłań stopy cukrzycowej (n=11), (2) pacjentów T2D z powikłaniami stopy cukrzycowej (podzielonych w zależności od stopnia obserwowanych powikłań, w sumie n=50), (3) pacjentów z chromaniem przestankowym poddanych wysiłkowi fizycznemu (n=12), (4) grupy kontrolnej zdrowych dawców krwi (n=13).

W rozdziale 'Materiały i Metody' Doktorant w zwięzły, ale klarowny sposób przedstawia metodykę i organizację badań, opisuje szczegółowo zastosowane materiały oraz przedstawia charakterystykę pacjentów, od których pobierano próby krwi. Autor zamieszcza też najważniejsze etapy procedur optymalizacyjnych izolacji i sortowania krążących komórek

proangiogennych oraz mezenchymalnych komórek zrębu. Rozdział ten pokazuje, że Doktorant zrealizował rozległy zakres badań za pomocą szeroko zakrojonych oraz zaawansowanych technik laboratoryjnych stosowanych w biologii molekularnej i komórkowej, w tym metody: PCR w czasie rzeczywistym, cytometrii przepływowej i sortowania komórek, ELISA, izolacji i różnicowania komórek macierzystych, analizy tworzenia sferoidów w matryzeli, analizy procesu angiogenezy i proliferacji komórek, pomiaru aktywności enzymów.

Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie 44 złożonych rycin i trzech tabel. Ta część dysertacji, podobnie jak cała praca, została przygotowana bardzo starannie pod względem graficznym i edytorskim. Jedyna moja uwaga dotyczy cytowanych na stronie 71 rycin 'Supplementary Figures 1-3', których nie udało mi się znaleźć w ocenianej pracy. Rozdział 'Wyniki' stanowi niewątpliwie najciekawszą i najbardziej cenną część rozprawy. Do najważniejszych rezultatów otrzymanych przez Doktoranta z pewnością należy wykazanie, że: (1) pacjenci z T2D bez powikłań, charakteryzują się obniżoną liczbą krążących komórek o fenotypie proangiogennym, mezenchymalnym i hematopoetycznym oraz zmienioną ekspresją genów kodujących oksygenazę hemową, natomiast powikłania cukrzycy, w szczególności zespół stopy cukrzycowej, wiążą się ze zwiększoną liczbą w/w komórek krążących we krwi oraz zwiększoną ekspresją genu *Hmox-1* w leukocytach; (2) wysiłek fizyczny oraz niedotlenienie mięśni u pacjentów z chromaniem przestankowym prowadzą do zwiększenia liczby krążących komórek proangiogennych oraz obniżenia ekspresji *Hmox-1* w leukocytach i stężenia TNF α w osoczu; (3) nasilenie parakrynej aktywności angiogennej ludzkich komórek CD34+ mobilizowanych do krwi obwodowej czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów jest niezależne od aktywacji oksygenazy hemowej-1; (4) mezenchymalne komórki zrębu pozbawione ekspresji genu *Hmox-1* charakteryzują się takim samym fenotypem oraz zdolnością różnicowania do komórek śródbłonna i tworzenia struktur naczyniopodobnych na matryzeli jak komórki typu dzikiego; (5) komórki mezenchymalne pozbawione oksygenazy hemowej-1 są odporne na stres oksydacyjny i toksyczne działanie heminy, co związane jest ze zwiększoną ekspresją genów szlaku glutationu.

Bardzo rzeczowa dyskusja, którą kończy podsumowanie i dobrze wyważone wnioski, potwierdza właściwą interpretację wyników własnych i znajomość literatury przedmiotu. W spisie cytowanych publikacji są 302 pozycje, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Pod względem edycyjnym spis literatury zawiera pewne uchybienia: czasami nazwy czasopism cytowane są skrótem, a w innych przypadkach podawane są całe tytuły, a w niektórych pozycjach (np. 22, 27, 59 itd.) brakuje nazw cytowanych czasopism.

Jest także kilka zagadnień, które wymagają doprecyzowania:

- Zastanawia mnie jak można wyjaśnić fakt, że atorwastyna zwiększa parakrynną aktywność angiogenną ludzkich komórek CD34+ w badaniach przeprowadzonych *in vitro*, jednak efekt ten nie był widoczny w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu podskórnych implantów matryzelowych.

- Podobnie, szereg badań przeprowadzonych na mysich szpikowych komórkach proangiogennych wykazało, że oksygenaza hemowa pełni kluczową rolę w regulacji ich potencjału angiogenego oraz aktywności parakrynej. Przeprowadzone w obecnej pracy eksperymenty nie potwierdziły istotnej roli tego enzymu w komórkach ludzkich – z czego może wynikać ta różnica?

- W pracy Doktorant podaje, że w celu stymulacji farmakologicznej genu *Hmox1* w badaniach zastosowano atorwastynę, kwas acetylosalicylowy, sulforafan, resweratrol oraz metforminę – dlaczego takie związki wybrano i jaka jest ich specyficzność względem oksygenazy hemowej?

- Zastanawia mnie także, czy liczebność grupy pacjentów poddanych wysiłkowi fizycznemu, na którą składało się 8 kobiet i 4 mężczyzn, jest wystarczająca by wyciągnąć jednoznaczne wnioski, zwłaszcza, że mamy tu do czynienia z różnicami płciowymi i na pewno zróżnicowaną wydolnością fizyczną.

Prosiłabym o ustosunkowanie się Doktoranta do powyższych uwag podczas obrony pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pana mgr. Witolda Nowaka oceniam bardzo wysoko. Wspomniane przeze mnie powyżej nieliczne krytyczne uwagi nie obniżają oceny całości rozprawy. Wartym podkreślenia jest także fakt, że podczas wykonywania pracy Doktorant wykazał się umiejętnością wykorzystania nowoczesnych technik doświadczalnych i metod analizy statystycznej, bardzo dobrą znajomością teoretycznych podstaw badanych zagadnień oraz umiejętnością rozwiązywania problemów naukowych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam zatem, że oceniana rozprawa doktorska 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. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Witolda Nowaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy prowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

A. Dolnyś