



**INSTYTUT GENETYKI i HODOWLI ZWIERZĄT  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA

Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

---

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Witolda Nowaka

„Wpływ stresu oksydacyjnego na komórki szpikowe – charakterystyka komórek zrębu tkankowego  
pozbawionych *Hmox1*”

przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Józkowicz

w Zakładzie Biotechnologii Medycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego

Oksygenaza hemowa-1 (HO-1) jest intensywnie badanym enzymem, któremu przypisywane są nieustannie coraz to nowe funkcje biologiczne. Na poziomie komórki klasyczna funkcja HO-1 polega na usuwaniu ze środowiska wewnątrzkomórkowego prooksydacyjnego hemu, z czym wiążą się jej właściwości antyoksydacyjne i cytoprotekcyjne. W skali całego organizmu, od dawna wiadomo, że HO-1 bierze udział w procesie o podstawowym znaczeniu w utrzymaniu ogólnoustrojowej homeostazy żelaza, a mianowicie w recyrkulacji żelaza hemowego zawartego w erytrocytach fagocytowanych przez makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego. W kontekście recenzowanej pracy doktorskiej istotna jest rola HO-1 w procesie powstawania naczyń krwionośnych, regulacji stanu zapalnego oraz w procesie różnicowania się komórek progenitorowych w kierunku komórek dojrzałych. W cukrzycy typu 2 obserwuje się zaburzenia funkcji komórek śródbłonka naczyniowego oraz obniżenie liczby i aktywności komórek proangiogennych mobilizowanych ze szpiku kostnego. Podjęcie przez Doktoranta próby wyjaśnienia roli HO-1 w mobilizacji subpopulacji komórek proangiogennych i w modulowaniu ich funkcji pod wpływem czynników stresowych (a szczególnie stresu oksydacyjnego) działających w wyżej wymienionej patologii jest w pełni uzasadnione i stanowi ambitne wyzwanie badawcze. Konsekwencją wyników uzyskanych w badaniach na komórkach pobranych od pacjentów z cukrzycą, było zbadanie już na modelu mysim właściwości mezenchymalnych komórek zrębu – MSC (typu dzikiego, *wild-type* i pozbawionych funkcjonalnego genu *Hmox1*). Jest to obecnie bardzo intensywnie badana populacja komórek, będąca między innymi ważnym elementem funkcjonalnym niszy macierzystych komórek hematopoetycznych, mogąca brać udział w powstawaniu i funkcjonowaniu naczyń krwionośnych i w hamowaniu reakcji zapalnej.



**INSTYTUT GENETYKI i HODOWLI ZWIERZĄT  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA

Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

Rozprawę doktorską rozpoczyna wykaz licznych europejskich i krajowych źródeł finansowania projektów badań będących jej przedmiotem oraz podziękowania dla wielu współpracowników naukowych (również spoza Zakładu Biotechnologii Medycznej; np. z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego), co już na samym wstępie sugeruje wielowątkowy charakter rozprawy. Dalej, napisana w języku angielskim praca, ma już typowy układ rozpraw dyplomowych. Zawiera następujące rozdziały: dwujęzyczne streszczenie, wstęp, cele, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Biorąc pod uwagę szeroki zakres tematyczny dysertacji zwraca uwagę jej zwięzłość - 123 strony w tym 16 stron z wykazem 302 pozycji literatury. We WSTĘPIE uderza lapidarna i dość ogólna charakterystyka oksygenazy hemowej-1, bądź co bądź kluczowego dla rozprawy enzymu. Domyślam się jednak, że w pracy wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Medycznej pod kierunkiem prof. Alicji Józkowicz alternatywą mógłby być tylko wielostronicowy elaborat na temat tego białka i jego funkcji. Ten skrótowy opis kompensuje zresztą bardzo przejrzysty schemat przedstawiający czynniki indukujące ekspresję genu *Hmox1*, przebieg reakcji katalizowanej przez HO-1 oraz różne aspekty cytoprotekcyjnej aktywności enzymu. Co istotne, Doktorant po szczegółowej charakterystyce mysich komórek mezenchymalnych zrębu (MSC) i opisie ich funkcji w podrozdziale 5.8, podejmuje temat HO-1 w kolejnym podrozdziale (5.9), ale już specyficznie w odniesieniu do jej roli właśnie w tych komórkach. Jest to zrozumiałe, z uwagi na to, że fenomen braku zmian w większości funkcji komórek MSC pozbawionych funkcjonalnego genu *Hmox1* i ich odporności na stres oksydacyjny wydaje się być wiodącym wątkiem rozprawy. Te dwa końcowe podrozdziały WSTĘPU to zręczna synteza na temat tej niejednorodnej populacji komórek macierzystych, ich potencjału do wielokierunkowego różnicowania się i ich oddziaływania na komórki układu immunologicznego (co zostało zilustrowane klarownym schematem) oraz roli, jakie w tych procesach odgrywa HO-1. CELE rozprawy sformułowane są zwięźle i jasno. Imponujący jest zakres technik użytych przez Doktoranta, opisanych w rozdziale MATERIAŁY i METODY. Opanowanie przez Doktoranta metod izolacji i identyfikacji (fenotypowania) różnych populacji komórek ludzkich i mysich, metod różnicowania mysich komórek MSC do komórek dojrzałych (osteoblastów, adipocytów, miofibroblastów, komórek śródbłonka naczyniowego), analizy funkcjonalnej komórek, określania ich parakrynej aktywności, analizy ekspresji genów, analizy statystycznej świadczy o dobrym przygotowaniu metodycznym do dalszej pracy naukowej np. w ramach staży typu „post-doc”. WYNIKI uzyskane w trakcie realizacji pracy



# INSTYTUT GENETYKI I HODOWLI ZWIERZĄT POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA

Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

doktorskiej są opisane w najdłuższym rozdziale na 34 stronach. Na podkreślenie zasługuje przystępny sposób prezentacji wyjątkowo dużej liczby uzyskanych wyników: czytelne ryciny, uzupełnione informatywnymi legendami, dobrej jakości zdjęcia mikroskopowe i nie przeładowane tabele. W mojej ocenie najcenniejszym wynikiem pracy jest, jak określa to sam Doktorant, niespodziewane odkrycie zjawiska odporności komórek MSC pozbawionych funkcjonalnego genu *Hmox1* na stres oksydacyjny. Samo zjawisko jest intrygujące z uwagi na powszechnie uznaną rolę HO-1 jako enzymu o właściwościach antyoksydacyjnych i cytoprotekcyjnych. Ciekawe są również wyniki dotyczące wyjaśnienia molekularnego podłoża odporności komórek MSC *Hmox1*<sup>-/-</sup> na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i wskazanie na wiodącą w tym procesie rolę genów metabolizmu glutationu (GSH) i peroksyredoksyny 6, enzymu zależnego od glutationu. Sposób poprowadzenia DYSKUSJI świadczy o dojrzałości Doktoranta jeśli chodzi o analizę i interpretację uzyskanych wyników i swobodzie z jaką konfrontuje je z licznymi wynikami innych Autorów. Przedstawienie wniosków w rozszerzonej, opisowej formie jest zabiegiem wychodzącym naprzeciw Czytelnikowi rozprawy w tym Recenzentowi. Każdy akapit rozdziału PODSUMOWANIE I WNIOSKI zawiera rekapitulację kolejnych badań przeprowadzonych kolejno: na komórkach pozyskanych od pacjentów z cukrzycą i chromaniem przestankowym, na komórkach CD34<sup>+</sup> mobilizowanych do krwi czynnikiem G-CSF, pobranych od zdrowych osobników, na mysich komórkach mezenchymalnych zrębu i fibroblastach pobranych od myszy *Hmox1*<sup>+/+</sup> i *Hmox1*<sup>-/-</sup> oraz stosowny wniosek lub wnioski.

Na podstawie analizy rozprawy nasuwają mi się następujące uwagi – częściowo krytyczne, częściowo o charakterze komentarza.

Czynniki stresowe, związane z różnymi ludzkimi patologiami takimi jak cukrzyca typu 2, cukrzyca z powikłaniami (syndromem stopy cukrzycowej), chromanie przestankowe oraz w obrębie tej ostatniej patologii z próbami wysiłkowymi (3-miesięcznym treningiem i jednorazowymi ćwiczeniami wysiłkowymi na bieżni) mogą być bardzo zróżnicowane. Niewątpliwie stres oksydacyjny jest jednym spośród patomechanizmów wymienionych zaburzeń ale na pewno nie jedynym. Moją wątpliwość budzi zatem fakt, czy użycie w tytule rozprawy sformułowania „*Wpływ stresu oksydacyjnego...*” nie jest zbyt dużym uproszczeniem, podyktowanym dążeniem do maksymalnej zwięzłości tytułu. Nie miałbym takiej wątpliwości, gdyby tytuł odnosił się tylko do badań na mysich komórkach MSC, w których zastosowano klasyczne modele stresu oksydacyjnego. Odnoszę również wrażenie, że badania przeprowadzone



**INSTYTUT GENETYKI i HODOWLI ZWIERZĄT  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA

Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

na komórkach pozyskanych od pacjentów z chromaniem przestankowym oraz od pacjentów poddanych terapeutycznemu treningowi chociaż bardzo ciekawe, nie wpisują się bezpośrednio w główny nurt pracy.

Odporność mezychymalnych komórek zrębu (MSC) na stres oksydacyjny oraz próby określenia molekularnego podłoża tego zjawiska należą – w moim przekonaniu – do jednych z najciekawszych wątków rozprawy doktorskiej, do których jednak mam najwięcej uwag. Po pierwsze z Rysunku 42A wynika, że komórki MSC poddawano działaniu egzogennej nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w stężeniach milimolarnych (od 200 do 800 mmol/L). Są to bardzo wysokie stężenia, niespotykane w układach biologicznych. Czy zatem nie nastąpiła tu pomyłka, a stężenia  $H_2O_2$  były w rzeczywistości stężeniami mikromolarnymi? Czy wiadomo jakiego rzędu stężenia  $H_2O_2$  indukowano w komórkach MSC i fibroblastach traktowanych 50  $\mu M$  heminą (Rysunek 45A-D)?

Istotnym elementem determinującym toksyczność  $H_2O_2$  w komórkach ssaków jest poziom jonów żelaza w tzw. cytoplazmatycznej labilnej puli żelaza (*labile iron pool*, LIP), co wynika z udziału zarówno jonów  $Fe^{2+}$  jak i  $H_2O_2$  w reakcji Fentona, której produktem jest rodnik wodorotlenowy. Taką prawidłowość opisano badając podłoże zróżnicowanej wrażliwości na działanie  $H_2O_2$  dwóch podlinii limfoblastów T białaczki mysiej L5178Y – komórek LY-R, wrażliwych na  $H_2O_2$ , charakteryzujących się wysokim poziomem LIP (ok. 0,6  $\mu M$ ) i komórek – LY-S odpornych na  $H_2O_2$ , o ponad 3-krotnie niższym poziomie LIP (Lipiński i wsp. Blood, 2000). Z czasem poziom jonów żelaza w LIP uznano jako wypróbowaną cechę odporności/wrażliwości komórek na działanie  $H_2O_2$ . Wydaje się, że pomiar poziomu LIP w komórkach MSC wniósłby ciekawą i ważną informację, pomocną w wyjaśnieniu fenomenu ich odporności na  $H_2O_2$ . Istotne dla określenia statusu żelazowego komórek MSC byłoby również oznaczenie markera błonowego CD71 (receptora transferyny, TfR1, który jest też wypróbowanym markerem proliferacji komórek), co zapewne nie stanowiłoby problemu przy okazji fenotypowania komórek metodą cytometrii przepływowej.

Doceniam podjętą na szeroką skalę przez Doktoranta próbę wyjaśnienia zjawiska odporności komórek MSC w oparciu o określenie ekspresji wielu genów, w szerokim tego słowa znaczeniu, genów antyoksydacyjnych, do których można zaliczyć geny wewnątrzkomórkowego metabolizmu żelaza i hemu oraz geny kodujące główne enzymy *sensu stricto* antyoksydacyjne (katalazę, peroksyredoksyny, enzymy cyklu glutationu i dysmutazy ponadtlenkowe). Uważam, jednak, że ograniczenie się do analizy ich ekspresji na poziomie mRNA jest zatrzymaniem się w



**INSTYTUT GENETYKI I HODOWLI ZWIERZĄT  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA  
Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

pół drogi w wyjaśnianiu przyczyn odporności na stres oksydacyjny. Ekspresja niektórych genów na poziomie transkryptu nie zawsze przekłada się na ekspresję na poziomie funkcjonalnego białka. Do takich genów można zaliczyć badane przez Doktoranta geny kodujące podjednostkę ciężką ferrytyny, ferroportynę, regulowane głównie przez potranskrypcyjny system IRP/IRE. Na podstawie literatury (Khan i Quigley, 2011 i 2013) wiadomo, że w przypadku ekspresji genu *Slc49A1* istnieją zasadnicze rozbieżności pomiędzy poziomami transkryptu i białka FLVCR1 w różnych tkankach i liniach komórkowych, co sugeruje, że FLVCR1 jest regulowany przez mechanizmy potranslacyjne. Wbrew tym uwagom pragnę podkreślić, że zaobserwowana przez Doktoranta mobilizacja genów wewnątrzkomórkowego metabolizmu glutationu jako mechanizmu obrony antyoksydacyjnej w komórkach MSC pozbawionych funkcjonalnego genu *Hmox1* i traktowanych heminą, jest mimo wszystko przekonująca. Wzrost ekspresji na poziomie transkryptu niektórych genów takich jak *Gclc*, *Gclm*, *Gss*, *Gsr* i *Gstp1* jest wielokrotny. Co istotne odnotowano bezpośrednie efekty podwyższonej ekspresji tych genów w komórkach MSC w porównaniu do mysich fibroblastów: bardziej korzystny stosunek GSH/GSSG, wyższy poziom GSH i niższy GSSG.

Za niezwykle ciekawą i trafną, szczególnie w sytuacji braku aktywności HO-1, uważam próbę analizy genów kodujących białka transportujące hem do komórek i z komórek do środowiska pozakomórkowego. Jest to obecnie bardzo intensywnie badana grupa białek, którym przypisuje się nie tylko rolę w procesie detoksyfikacji hemu ale również w fizjologicznym obiegu żelaza hemowego w komórce i w skali całego ustroju. Do pełnego obrazu zabrakło jednak analizy takich genów jak *Slc49A2*, kodującego białko FLVCR2, importujące hem do komórek (mutacje genu *SLC49A2* leżą u podłoża zespołu Fowlera, występującej u ludzi waskulopatii w ośrodkowym układzie nerwowym), *Lrp1* (*low density lipoprotein receptor-related protein*) kodującego białko CD91 – receptor kompleksu hem-hemopeksyna, *Abcg2* (*ATP-binding cassette, sub-family G member*) kodującego białko ABCG2, eksporter hemu. Z drugiej strony w dyskusji wyników tej części rozprawy doktorskiej nie znalazła się (a wydaje mi się, że powinna się znaleźć) wzmianka dotycząca tego, że funkcja białka HCP1 jako importera hemu do komórek została silnie podważona, przynajmniej w odniesieniu do jego lokalizacji na błonie apikalnej enterocytów i jego ewentualnej roli jako białka biorącego udział w absorpcji hemu w dwunastnicy (Qui i wsp., 2006).

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska świadczy o wysokich umiejętnościach mgr Witolda Nowaka w zakresie planowania,



**INSTYTUT GENETYKI i HODOWLI ZWIERZĄT  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. POSTĘPU 36 A, JASTRZĘBIEC, 05-552 MAGDALENKA  
Tel. 022 7561711, Fax: 022 7561417, 022 7561699

przeprowadzenia, opisanie i analizy doświadczeń. Tematyka pracy jest niezwykle aktualna i wpisuje się w szeroko zakrojoną dyskusję nad potencjalnym zastosowaniem HO-1 w różnych aspektach medycznych. Ciekawe i niestandardowe są tok i chronologia głównego nurtu prowadzonych badań: od obserwacji i wyników uzyskanych na komórkach pobranych od pacjentów z cukrzycą typu 2, poprzez wyselekcjonowanie do dalszych badań komórek MSC, pozyskanie ich od myszy  $Hmox1^{+/+}$  i  $Hmox1^{-/-}$ , hodowle *in vitro* w warunkach zróżnicowanych poziomów glukozy i wreszcie po analizę ich właściwości i funkcji, co zaowocowało odkryciem intrygującego zjawiska odporności na stres oksydacyjny przy braku aktywności HO-1.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Zwracam się więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgr Witolda Nowaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jastrzębiec, 15 lutego 2016

Prof. dr hab. Paweł Lipiński