

Warszawa 7.05.2019

dr hab. Paweł Dobrzyń, prof. Instytutu Nenckiego PAN
Kierownik Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Tomczyka

Wrodzona odpowiedź odpornościowa w następstwie zawału serca – znaczenie makrofagów tkankowych i oksygenazy hemowej 1

Niewydolność serca to stan, w którym mięsień sercowy nie może zapewnić odpowiedniego przepływu krwi przez wszystkie tkanki i narządy. Powodem tego jest ograniczenie skurczowej i rozkurczowej funkcji serca, do którego prowadzi, w konsekwencji, każde wieloletnie schorzenie kardiologiczne: choroba niedokrwienna serca, zmiany miażdżycowe, wady zastawkowe, nadciśnienie, jak również inne schorzenia układowe, np. zapalenia wirusowe. Warto podkreślić, że choroby układu sercowo-naczyniowego są przyczyną blisko 30% wszystkich zgonów na świecie. W Polsce ponad 90 tysięcy osób umiera z powodu chorób serca każdego roku. Mimo ogromnego postępu wiedzy, mechanizmy leżące u podstaw rozwoju i przebiegu choroby niedokrwiennej serca nie są do końca poznane. Obok uwarunkowań genetycznych istotną rolę w patogenezie chorób serca wydaje się odgrywać postępujący proces miażdżycowy. Dostępne wyniki badań wskazują, że ważnym elementem układu odpornościowego zaangażowanym w rozwój zmian miażdżycowych i przebudowę serca po zawale są monocyty i makrofagi. Oksygenaza hemowa-1 (HO-1), enzym katalizujący reakcję degradacji hemu, hamuje produkcję oraz właściwości zapalne monocytów i makrofagów, co ogranicza uszkodzenie serca po zawale. Dlatego też, postawiony w rozprawie cel badań, tj. określenie roli HO-1 w regulacji funkcji monocytów i makrofagów w warunkach niedokrwienego uszkodzenia serca należy uznać za bardzo trafny i zasadny. W celu określenia roli HO-1 w regulacji odpowiedzi ze strony monocytów i makrofagów w warunkach niedokrwienego uszkodzenia serca użyto myszy z nokautem genu kodującego HO-1 oraz myszy typu dzikiego, u których wywołano zawał mięśnia sercowego poprzez podwiązanie gałęzi międzykomorowej przedniej lewej tętnicy wieńcowej. Znaczenie HO-1 w procesie monocytopeny poza szpikowej w modelu zawału serca określono poprzez analizę różnych subpopulacji monocytów w śledzionie. Charakterystykę populacji makrofagów sercowych pochodzenia embrionalnego, wyizolowanych z



serc 4-5 dniowych noworodków myszy z zahamowaną ekspresją HO-1 i zwierząt typu dzikiego, wykonano z użyciem cytometrii przepływowej. Warty podkreślenia jest szeroki wachlarz przeprowadzonych eksperymentów oraz nowatorskie podejście do tematyki podjętych badań.

Praca doktorska mgr. Mateusza Tomczyka zrealizowana została w Zakładzie Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Dulaka oraz dr Agnieszki Jaźwy-Kusior, którzy od wielu lat z ogromnym sukcesem zajmują się badaniami nad rolą HO-1 w regulacji mechanizmów uszkodzenia i regeneracji mięśnia sercowego.

Rozprawę doktorską mgr. Mateusza Tomczyka stanowi liczące 125 stron opracowanie przygotowane w języku polskim. Praca ma klasyczny układ dla dysertacji doktorskich w zakresie nauk przyrodniczych. Składa się z sześciu zasadniczych części, obejmujących przegląd literatury wprowadzający czytelnika w problematykę rozprawy, cele pracy, opis stosowanych metod i materiałów, prezentację wyników oraz ich dyskusję zakończoną wnioskami końcowymi. Poza tym, praca zawiera wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz obszerny spis literatury. W 23-stronicowym wstępie teoretycznym, w przejrzysty sposób opisano zagadnienia wprowadzające i uzasadniające podjęte badania naukowe. Przedstawiono m. in. aktualny stan wiedzy odnośnie oksygenazy hemowej, monocytów i ich roli w rozwoju miażdżycy oraz odpowiedzi zapalnej organizmu związanej z zawałem serca. Całość została zilustrowana pięcioma czytelnymi rycinami, które zostały w znacznej części zaadaptowane z pracy pogładowej opublikowanej w czasopiśmie *Vascular Pharmacology*, w której Doktorant jest pierwszym autorem. Wskazuje to na szeroką wiedzę Doktoranta w zakresie przedstawionej w części teoretycznej problematyki badawczej.

Logicznie zaplanowane eksperymenty zrealizowane zostały za pomocą szerokiego spektrum właściwych i adekwatnych do kolejnych zadań metod biochemicznych i biologii molekularnej, co wymagało od Doktoranta opanowania bogatego warsztatu badawczego. Wykorzystywano m. in. cytometrię przepływową i immunofenotypowanie, technikę Western blot, test ELISA, analizę stężeń cytokin prozapalnych w osoczu za pomocą Luminex, ilościową analizę ekspresji genów. Opis stosowanych metod, a także odczynników biologicznych i chemicznych, jest precyzyjny i stanowi najlepsze potwierdzenie rzetelności przeprowadzonych badań. Warto podkreślić, że analizy biochemiczne były wykonane na materiale uzyskanym od zwierząt poddanym eksperymentom *in vivo*, które także zostały w rozprawie opisane bardzo skrupulatnie. Na podziw zasługuje opanowanie przez Doktoranta rzadko spotykanej umiejętności wywołania zawału mięśnia sercowego u myszy, który to stan został dokładnie potwierdzony przez analityczne metody ilościowe (tj. poprzez określenie udziału komórek, które znalazły się w otoczeniu z obniżonym stężeniem parcjalnym tlenu

oraz poprzez pomiar troponiny I w osoczu) oraz echokardiografię. Szkoda, że w rozprawie nie przedstawiono sposobu wyliczenia frakcji wyrzutowej i frakcji skracania przy analizie echokardiograficznej, gdyż są to parametry obliczane pośrednio na podstawie innych zdefiniowanych pomiarów funkcjonalnych serca.

Za najcenniejszą część każdej rozprawy doktorskiej uważam opis uzyskanych wyników. Tak jest i tym razem. W rozprawie przedstawiona została imponująca ilość danych doświadczalnych. Zostały one zaprezentowane na 20 wielopanelowych rycinach, które zostały przygotowane bardzo starannie pod względem graficznym. Warto tutaj nadmienić, że rezultaty te zostały już w znacznej części opublikowane w roku 2017 w prestiżowym czasopiśmie *Basic Research in Cardiology*. W moim przekonaniu, również pozostałe wyniki przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej mają szansę na publikację w równie dobrym czasopiśmie w dziedzinie.

Następnym rozdziałem jest 14-stronicowa dyskusja. Została ona podzielona na tematyczne podrozdziały i zawiera właściwe omówienie i interpretację uzyskanych rezultatów w odniesieniu do literatury w temacie. Za najbardziej istotne odkrycia przeprowadzonych badań należy uznać: (1) wykazanie, że w czasie kilku dni po zawale brak HO-1 zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia śmiertelnego w skutkach pęknięcia wolnej ściany lewej komory serca, co jest związane z większą produkcją kolagenu w obszarze zawałowym. Jednak w późniejszym czasie po zawale brak HO-1 przyczynia się do znacznego upośledzenia funkcji lewej komory, przerostu kardiomiocytów, zwiększonego stanu zapalnego, intensywnej mobilizacji i nadmiernej infiltracji uszkodzonego miokardium przez monocyty i w efekcie do rozwoju ciężkiej niewydolności serca; (2) identyfikację śledziona jako źródła monocytów obecnych w krwi myszy HO-1^{-/-} po zawale, co przyczynia się do rozwoju dysfunkcji lewej komory serca; (3) wskazanie, że u myszy pozbawionych ekspresji HO-1 już od kilku dni po urodzeniu dochodzi do zwiększonego napływu monocytów do serca, co w efekcie prowadzi do utraty populacji embrionalnych makrofagów posiadających właściwości protekcyjne i naprawcze. Podobny efekt zaobserwowano u myszy typu dzikiego, u których embrionalne makrofagi zostały usunięte przed wywołaniem zawału za pomocą liposomów z klodronianem dwusodowym, co spowodowało upośledzenie pozawałowej funkcji lewej komory do poziomu obserwowanego u myszy HO-1^{-/-}.

Zaprezentowane w pracy badania dostarczyły oryginalnych i ważnych poznawczo wyników, pozwalających lepiej zrozumieć molekularne i komórkowe mechanizmy patogenezy dysfunkcji mięśnia sercowego. Uzyskane wyniki sugerują, że modulacja ekspresji / aktywności HO-1 po zawale serca z zachowaniem odpowiedniego reżimu czasowego może stanowić obiecujące podejście we wspieraniu istniejących terapii po zawale.



Oceniając formalną stronę dysertacji stwierdzam, że rozprawa została przygotowana z bardzo dużą starannością zarówno pod względem językowym, jak i edytorskim. Drobną uwagę dotyczy czytelności ryciny 17A. Zaprezentowane zdjęcia są stosunkowo małe, co utrudnia dostrzeżenie opisywanych w tekście zmian. Na szczęście zdjęcia o wysokiej rozdzielczości możemy znaleźć w wyżej wspomnianej pracy opublikowanej przez Doktoranta w czasopiśmie *Basic Research in Cardiology*. Dwukrotnie także pomyłono numerację podrozdziałów. W rozdziale Wstęp (str. 24) numery podrozdziałów rozpoczynają się ponownie od numeru 7.2.1. Podobna sytuacja jest w rozdziale Dyskusja, gdzie na str. 96 numeracja podrozdziałów rozpoczyna się ponownie od 11.1. Także spis literatury zawiera pewne uchybienia edycyjne: czasami nazwiska autorów są napisane w całości wielkimi literami, w innych przypadkach tylko pierwsze litery nazwisk są duże; podobna uwaga dotyczy tytułów artykułów – czasami każde słowo zaczyna się z wielkiej litery, a w innych przypadkach z małej litery. Także w skrócie tytułu czasopisma Proc. Natl. Acad. Sci. prawdopodobnie zgubiono ostatni człon, czyli USA.

Niezależnie od mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji, czuję się w obowiązku przedstawić kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu:

- jaki procent myszy przeżywał przeprowadzoną procedurę prowadzącą do wywołania zawału serca?
- wg przedstawionego opisu metod i wyników, dane są średnią uzyskaną zarówno z badań przeprowadzonych na samicach i samcach myszy. Dlaczego grupy badane nie zostały podzielone w zależności od płci zwierząt? Czy analiza poszczególnych osobników podzielonych ze względu na płeć wykazuje różnice / inne tendencje zmian w badanych parametrach?
- w rozprawie poziom istotności statystycznej (p) ustawiono jako $p \leq 0,05$, podczas gdy jest to zazwyczaj wartość $p < 0,05$. Czy jest to zabieg celowy związany w wykonanymi testami statystycznymi, czy też prosta pomyłka edytorska? Jeśli jest to pomyłka to na pewno warto ją poprawić w erracie i dołączyć do rozprawy.
- po czterech dniach od wywołania zawału, śmiertelność myszy HO-1-/- spowodowana pęknięciem ściany serca była mniejsza niż myszy typu dzikiego, co wiązało się ze zwiększoną produkcją kolagenu w obszarze zawałowym. Czy zwiększoną zawartość kolagenu obserwowano także po 21 dniach od wykonania procedury? Jeśli tak, to jak fakt ten mógł wpływać na rozwój stanu zapalnego, mobilizację monocytów itp. w sercach tych zwierząt?
- rozdział ‘Wnioski końcowe’ zawiera w mojej ocenie podsumowanie uzyskanych wyników, a brak jest ostatecznego wniosku/wniosków.

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



Wniosek końcowy

Pracę doktorską mgr. Mateusza Tomczyka pt. *"Wrodzona odpowiedź odpornościowa w następstwie zawału serca – znaczenie makrofagów tkankowych i oksygenazy hemowej I"* oceniam bardzo pozytywnie. Przedstawiona dysertacja wskazuje na opanowanie bogatego warsztatu badawczego i zaangażowanie zarówno intelektu, jak ogromnego nakładu pracy. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład poznawczy w temacie patogenezy dysfunkcji kardiomiocytów, jak i regeneracji serca po zawałe. Wyniki badań stanowiące podstawę dysertacji doktorskiej zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej, a informacje przedstawione we Wstępie w pracy poglądowej. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Mateusza Tomczyka spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Mateusza Tomczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Renata Dobrzyńska