

Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wawak

pt. „Rola białek transportu steroli z rodziny StAR w promowaniu stresu oksydacyjnego przez wodoronadtlenki cholesterolu 7-OOH w komórkach aktywowanych makrofagów; mechanizm i cytotoksyczne konsekwencje”

Badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wawak dotyczą roli białek z rodziny StAR transportujących sterole. Transport cholesterolu ma istotne znaczenie, bowiem jego zaburzenia mogą prowadzić do rozwoju miażdżycy. Zmiany w ścianach tętnie są przyczyną zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu oraz niedokrwienia kończyn dolnych.

Choroby układu krążenia związane są z wysoką śmiertelnością, zawał serca jest pierwszą, a udar mózgu trzecią przyczyną śmierci pacjentów. Oprócz cholesterolu w rozwoju miażdżycy uczestniczą również inne czynniki, takie jak lipoproteiny małej i dużej gęstości HDL i LDL, triglicerydy oraz homocysteina. W etiopatogenezie miażdżycy istotną rolę odgrywa stres oksydacyjny, a utlenianie lipoprotein o małej gęstości związane jest z rozwojem tej choroby. U podstaw mechanizmu rozwoju choroby leży adhezja monocytów do komórek śródbłonna, która jest początkowym etapem rozwoju miażdżycy w warunkach fizjologicznych. Dodatkowo, w miejscu tym, przenikają w głąb naczynia utlenione lipoproteiny LDL. Migracja monocytów do błony wewnętrznej prowadzi do transformacji ich w makrofagi i komórki piankowate. Miażdżycę jest przewlekłym stanem zapalnym, a nadtlenek wodoru i nadtlenki organiczne nasilają ten proces. Nadmierne generowanie reaktywnych form tlenu prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, osłabienia obrony przeciwutleniającej i rozwoju stresu oksydacyjnego. W stanie zapalnym dochodzi również do uwalniania mediatorów zapalnych, które prowadzą do zmian strukturalnych w ścianach naczyń. Stan zapalny jest również związany z oddziaływaniem między komórkami

zapalnymi, takimi jak neutrofile, limfocyty, monocyty, makrofagi, a komórkami śródbłonna i komórkami mięśni gładkich naczyń. W nurt badań nad mechanizmem miażdżycy włącza się tematyka badawcza realizowana przez mgr Katarzynę Wawak.

Rozprawa doktorska ma typowy układ przyjęty dla prac doktorskich i obejmuje streszczenie w językach: polskim i angielskim, wstęp, metody, wyniki, dyskusję i wnioski. Niespodziewanie, po rozdziale Dyskusja i wnioski, Autorka umieściła rozdział „Dalsze kierunki badań-analiza dynamiki mitochondriów” pokazując wstępne wyniki badań, które zamierza kontynuować w przyszłości. Umieszczony jest również suplement związany z badaniami dynamiki mitochondriów.

W części teoretycznej Autorka scharakteryzowała lipoproteiny osocza oraz ich udział w procesie miażdżycy, a także udział różnych typów komórek, w etiopatologii tej choroby. W dalszej części pracy omówiła rolę receptorów lipoprotein, metabolizm lipidów oraz dwustronny (eksport, import) transport cholesterolu. Na uwagę zasługuje podrozdział omawiający białka regulujące steroidogenezę (StAR). Kolejne podrozdziały dostarczają informacji na temat zwrotnego transportu cholesterolu z komórek i tkanek do wątroby oraz cholesterolu z komórek. Niewątpliwie interesującym podrozdziałem jest omówienie utleniania cholesterolu do różnych pochodnych, w tym również do wodoronadtlenków, bowiem wodoronadtlenki cholesterolu były stosowane przez Autorkę w części doświadczalnej rozprawy doktorskiej.

Celem pracy było sprawdzenie, czy białka z rodziny StAR w warunkach stresu oksydacyjnego transportują wodoronadtlenki cholesterolu oraz wykazanie ich udziału we wczesnych etapach miażdżycy. By zrealizować powyższe cele, Autorka sprawdziła m.in. ekspresję białek transportujących cholesterol, wychwyty wodoronadtlenku cholesterolu (7-OOH) (Chol 7-OOH), jego cytotoksyczność, wpływ na wytwarzanie 27-hydroksycholesterolu oraz rolę w jego eksporcie do akceptorów apoA-1 i HDL.

W rozdziale Metody, Autorka opisała stosowany materiał, ludzkie makrofagi THP-1 oraz makrofagi mysie RAW 264.7 (charakteryzujące się mniejszą ekspresją białka STARD4) oraz różnorodne metody badawcze stosowane w biologii molekularnej, które używała w realizacji części doświadczalnej. Można tu wymienić m.in. transfekcję komórek, metodę PCR w czasie rzeczywistym, analizę ekspresji genów i inne. Na początku tego rozdziału opisała syntezę wodoronadtlenku cholesterolu (7-OOH) (Chol 7-OOH), którym traktowała w/w komórki. Na końcu podrozdziału 4.3.1. w ostatnim zdaniu brakuje składu jednowarstwowych liposomów SU. Ich skład i preparatykę umieściła w rozdziale 4.5. ale wcześniej warto było

podać tę informację. Ekspresję białek po traktowaniu komórek wodoronadtlenkiem cholesterolu (7-OOH) określiła metodą Western blot, a pomiaru wychwytu (Chol 7-OOH) dokonywała przy użyciu znakowanego izotopem ^{14}C jego analogu ($[^{14}\text{C}]$ 7-OOH). Przeżywalność komórek określiła testem MTT, a potencjał błonowy przy użyciu sondy fluorescencyjnej JC-1.

Otrzymane wyniki poddała właściwie zastosowanej analizie statystycznej z użyciem testu t-Studenta, jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Natomiast obliczenia przeprowadziła stosując program GraphPad Prism 5.0.

Opisane wyniki zostały udokumentowane licznymi rysunkami oraz zdjęciami. Autorka wykazała, że spośród pięciu białek zaangażowanych w transport cholesterolu, ekspresji ulegały białka STARD1 i ABCA1. Natomiast w komórkach THP-1 z wyciszonym genem *STARD1* niewielkiej ekspresji ulegało białko ABCA1. Z kolei wychwyty wodoronadtlenku cholesterolu (7-OOH) najszybszy był w komórkach THP-1 stymulowanych dibutyrylo cAMP bez wyciszonego genu *STARD1*. Podobne wyniki Autorka otrzymała w przypadku mitochondriów, jednak wychwyty w nich przewyższał wychwyty przez całe komórki. Natomiast w komórkach RAW 264.7 stymulacja ich prowadziła do dwukrotnego wzrostu poziomu białek STARD1 i STARD4, jak również zwiększonego wychwytu Chol 7-OOH, a wyciszenie genu *STARD1* prowadziło do spadku jego wychwytu.

Pomiary cytotoksyczności Chol 7-OOH wykazały, że komórki THP-1 z podwyższonym poziomem ekspresji białka STARD1 były bardziej wrażliwe na uszkodzenia niż z poziomem normalnym. Natomiast pomiary przeprowadzone przy użyciu t-butyłowodoronadtlenku (t-BuOOH) wykazały podobną toksyczność w komórkach stymulowanych i niestymulowanych. W komórkach z wyciszonym genem *STARD1* toksyczność Chol 7-OOH była niższa niż w niewyciszonym. Poziom białka STARD1 nie miał wpływu na cytotoksyczność indukowaną przez t-BuOOH. Podobne zależności obserwowała Autorka w przypadku komórek RAW 264.7.

Przeprowadzone badania cytotoksyczności 7-keto- oraz 7-hydroksycholesterolu występujących w utlenionej lipoproteinie LDL (oxLDL) w stężeniach znacznie przekraczających warunki fizjologiczne, wykazały, że były one dobrze tolerowane przez komórki THP-1. Pomiary potencjału błonowego błony mitochondrialnej w komórkach z wyciszonym genem *STARD1* charakteryzowały się pięciokrotnie wyższym potencjałem niż komórki kontrolne. Traktowanie komórek Chol 7-OOH prowadziło do spadku potencjału.

który był niższy w komórkach stymulowanych niż w niestymulowanych. Kolejnym ciekawym rezultatem było stwierdzenie, że wyciszenie genu *STARD1* prowadziło do obniżenia peroksydacji lipidów w komórkach traktowanych Chol 7-OOH. Mimo, że stosowane stężenia Chol 7-OOH nie prowadziły do spadku przeżywalności komórek to obniżały aktywność białka CYP27A1 o ok. 40%.

Metodą Western blot, Autorka wykazała, że traktowanie komórek niestymulowanych Chol 7-OOH nie wpływało na poziom białka STARD1, ale ulegał obniżeniu o 50% jego poziom w komórkach stymulowanych. Przeprowadzona równoległe analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała spadek mRNA w komórkach stymulowanych. Nie podała jednak, czy chodzi o komórki ludzkie, czy mysie. Nieoczekiwane wyniki otrzymała Autorka badając białko CYP27A1, stwierdzając dwukrotny wzrost jego poziomu po stymulacji makrofagów i traktowaniu ich Chol 7-OOH.

Przeprowadzone badania przy użyciu znakowanego trytem (^3H) cholesterolu wykazały znacznie wolniejszy jego wypływ w komórkach stymulowanych po działaniu Chol 7-OOH niż w komórkach niestymulowanych.

Na uwagę zasługuje podsumowanie uzyskanych wyników na końcu każdego z podrozdziałów.

W rozdziale *Dyskusja* Autorka omówiła otrzymane rezultaty w konfrontacji z właściwie dobraną literaturą, umieszczając ogółem w pracy 268 cytowań. Rozdział napisany jest ciekawie, a dyskusja przeprowadzona jest rzeczowo i wystawia dobrą opinię Autorce. W rozdziale tym Autorka umieściła schemat transportu cholesterolu w komórce.

Rezultatem przeprowadzonych badań są liczne wnioski, które w rzeczywistości są podsumowaniem uzyskanych wyników. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem Autorki jest pokazanie mechanizmu, w który zwrotny transport cholesterolu może być uszkodzany przez jego pochodne wodoronadtlenkowe. Odkrycie to dostarcza nowych informacji na temat uszkodzeń oksydacyjnych makrofagów, które odgrywają kluczową rolę w patofizjologii miażdżycy.

Rozprawa doktorska napisana jest i zredagowana starannie, choć jej Autorka nie uniknęła błędów, które zostały przytoczone poniżej:

- str. 10, zamiast nadtlenek lipidowy powinno być wodoronadtlenek lipidowy
- str. 13, zamiast trójglicerydy powinno być triglicerydy

str. 13. w przypadku lipoprotein osocza zamiast bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego powinno stosować się: LDL - lipoproteina o małej gęstości, IDL - lipoproteina pośredniej gęstości, HDL - lipoproteina o dużej gęstości

str. 25. ...katalizowane przez Cu^{2+} i mechanizm mieloperoksydazy /peroksynitrytu. O co chodzi w tym zdaniu? Mam nadzieję, że Autorka to wyjaśni.

str. 36 rodnik peroksyłowy zamiast nadtlenkowy

O innych błędach poinformowałem Autorkę

Uwagi te nie obniżają wartości merytorycznej pracy, która oceniam bardzo wysoko. Zawiera, bowiem, wiele oryginalnych i interesujących danych.

Dorobek naukowy mgr Katarzyny Wawak składa się z pięciu artykułów opublikowanych w FEBS Letters (2014), Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (2015) będących podstawą pracy doktorskiej oraz Free Radical Biology and Medicine (2017), Cancer Cell and Microenvironment (2017) i Apoptosis (2018). Nie ulega wątpliwości, że badania przeprowadzone przez Autorkę mają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Wawak spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Autorka zrealizowała postawione cele badawcze tworząc oryginalne opracowanie, które wystawia Jej wysoką ocenę i świadczy o dużej wiedzy i umiejętnościach samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych. Jej sukces jest niewątpliwą zasługą promotora, Pana Prof. dr hab. Witolda Korytowskiego.

W oparciu o przedstawioną ocenę pracy, jej wysoki poziom metodyczny i merytoryczny, mam przyjemność zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Wawak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wartości związane z aktualną tematyką rozprawy wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o wyróżnienie pracy.



Łódź, 9 maja 2019