

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Piłat

pt. „*Modulatory effects of melanosomes on expression of heme oxygenase-1 in retinal pigment epithelium cells under oxidative stress in vitro*”

Zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (*age-related macular degeneration*, AMD) jest chorobą bardzo istotną w skali społecznej jako główna przyczyna utraty wzroku przez osoby starsze w społeczeństwach uprzemysłowionych. Ocenia się że około 10% osób w wieku 66-74 lat i około 30% osób w wieku 75-85 lat cierpi na AMD. Jak wynika ze statystyk, chorobą tą dotkniętych jest około 1,9 miliona Polaków, a u 600 tysięcy nich choroba wkroczyła w zaawansowane stadium.

Przyczyną AMD są zmiany zachodzące w siatkówce, a zasadniczą rolę w etiopatogenezie tej choroby grają procesy zachodzące w upigmentowanym nabłonku siatkówki (RPE). Z tego względu badania funkcji nabłonka pigmentowanego siatkówki i ich zmian podczas starzenia się organizmu mogą w istotny sposób przyczynić się do zrozumienia mechanizmu powstawania AMD i możliwości modyfikacji przebiegu tej choroby. W tym ważnym, aktualnym i fascynującym nurcie badań, prowadzonym konsekwentnie od szeregu lat w zespole prof. Tadeusza Sarny, osadzona jest rozprawa doktorska mgr Anny Piłat.

Napisana w języku angielskim rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Otwiera ją *Wprowadzenie (Introduction)*, w ramach którego Doktorantka omawia funkcję i organizację siatkówki, strukturę i funkcję nabłonka pigmentowanego siatkówki, komórki linii ARPE-19 jako model komórek nabłonka pigmentowanego człowieka, stres oksydacyjny i główne układy antyoksydacyjne w komórkach nabłonka pigmentowanego siatkówki oraz strukturę i funkcję melaniny. Ta część pracy jest napisana w sposób kompetentny i jest świetnym wprowadzeniem w część doświadczalną rozprawy. Istotną sprawą, na którą zwraca uwagę Doktorantka, jest utrata melanosomów przez komórki nabłonka pigmentowanego hodowane *in vitro*. Komórki te mogą jednak fagocytować melanosomy, co daje bardzo ciekawą możliwość badania wpływu obecności melanosomów wewnątrz komórki na właściwości

komórek nabłonka pigmentowanego, w szczególności ich oporność i odpowiedź na stres oksydacyjny. Te z kolei zależą głównie od indukcji biosyntezy białek antyoksydacyjnych. Jako cel badań będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Anna Piłat postawiła sobie określenie modulatorowego efektu pochłonięcia przez komórki melanosomów na ekspresję oksygenazy hemowej-1 i innych enzymów antyoksydacyjnych w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez nadtlenek wodoru, promieniowanie nadfioletowe i reakcję fotodynamiczną. Zamiarem Autorki rozprawy było także zbadanie wpływu melanosomów wzbogaconych w żelazo na poziom ekspresji genów oksygenaz hemowych 1 i 2, katalazy, peroksydazy glutationowej i ferrytyny w komórkach ARPE-19 oraz stwierdzenie, czy zmiany właściwości fizykochemicznych melanosomów zachodzące podczas starzenia się organizmu mogą modyfikować właściwości antyoksydacyjne tych organelli. Cel pracy (i jej zawartość) wykraczają zatem poza tytuł pracy zapowiadający jedynie badania oksygenazy hemowej-1.

Zastosowana metodyka obejmująca m. in. izolowanie melanosomów z komórek nabłonka pigmentowanego siatkówki świni i krowy, oczyszczanie melanosomów, ich wzbogacanie w żelazo, hodowlę komórek nabłonka pigmentowanego siatkówki, śledzenie w czasie rzeczywistym wnikania jodku propidyny do komórek, analizę poziomu białek antyoksydacyjnych techniką Western blot i charakterystykę właściwości melanosomów z komórek nabłonka pigmentowanego oczu ludzi w różnym wieku budzi moje uznanie.

Materiały i metody (*Materials and methods*) opisane są w zasadzie należycie szczegółowo, jakkolwiek można się zastanawiać, czemu np. podane są stosowane rozcieńczenia przeciwciał przeciw peroksydazie glutationowej i oksygenazom hemowym, a nie przeciwciał przeciw aktynie. Nie zaszkodziłoby podanie numerów katalogowych przeciwciał, gdyż np. firma Abcam oferuje szereg (obecnie 29) przeciwciał przeciw różnym izoenzymom (1, 3, 4, 7) peroksydazy glutationowej (nawiasem pisząc, nie znalazłem wśród nich przeciwciała mysiego poliklonalnego, jakie – zapewne pomyłkowo – podane jest na s. 39 rozprawy). Nie jest też sprecyzowany sposób standaryzacji ilości próbek poddawanych elektroforezie i blotingowi zwłaszcza w opisie procedury A (s. 49). W opisie procedury B Doktorantka pisze, że na żel nanosiła 0,6 µg próby; wydaje mi się, że miała na myśli raczej 0,6 µg białka. Nie jest określona moc światła niebieskiego, którego działaniu były poddawane

komórki (s. 46).

Białka antyoksydacyjne, których poziom Doktorantka oznaczła w komórkach to katalaza, peroksydaza glutationowa, oksygenazy hemowe 1 i 2 oraz (w części doświadczeń) ferrytyna. Moim zdaniem nieco brakuje w rozprawie uzasadnienia wyboru białek poddanych analizie. Dlaczego np. nie były analizowane dysmutazy ponadtlenkowe? Pewną odpowiedź na to pytanie znajdujemy na s. 30, w postaci odniesienia do wyników badania POLA, które nie wykazało związku pomiędzy aktywnością dysmutazy i AMD. Jak się jednak wydaje, te wyniki nie mogą jednak stanowić zbyt mocnego uzasadnienia dla rezygnacji z oznaczeń poziomu dysmutaz ponadtlenkowych, a podjęcia analizy poziomu peroksydazy glutationowej; badanie dotyczyło tylko poziomu erytrocytarnej dysmutazy ponadtlenkowej (czyli SOD-1, z pominięciem SOD-2 i SOD-3) i osoczowej (a więc nie wewnątrzkomórkowej) peroksydazy glutationowej (GPx3). Nie jest też dla mnie jasny powód badania poziomu oksygenazy hemowej 2, która jest enzymem konstytutywnym – ale być może miał to być enzym odnośnikowy.

Podoba mi się pomysłowa idea badań. Sam proces fagocytozy jest z pewnością znaczącym wydarzeniem w życiu komórki śródbłonna upigmentowanego, słusznie więc Autorka rozprawy badała także wpływ fagocytozy kuleczek lateksu na badane parametry, by móc ocenić wpływ na nie samego procesu fagocytozy.

We wstępnym doświadczeniu Doktorantka badała poziom białek antyoksydacyjnych w funkcji czasu po pasażu komórek. Stwierdziła, że hodowla osiągała konfluencję po upływie 7 dni od pasażu i że po tym czasie następuje w komórkach wzrost poziomu peroksydazy glutationowej. Ta informacja jest o tyle niepełna, że porównywalny wzrost poziomu peroksydazy glutationowej miał miejsce już po 3 dniach (Fig. 2, s. 54); omówienie tego wyniku znajdujemy dopiero w Dyskusji (s. 87). Doktorantka zdecydowała się na badanie poziomu białek antyoksydacyjnych w komórkach konfluentnych. Komórki, które fagocytowały melanosomy lub kulki lateksu, namnażały się wolniej, słusznie więc Doktorantka badała w nich zmiany poziomu białek antyoksydacyjnych 7 dni po fagocytozie czyli 14 dni po pasażu. Nieco brakuje mi w pracy stwierdzenia, że po tym czasie komórki fagocytykujące osiągnęły stan konfluencji.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka badała stres oksydacyjny na poziomie subletalnym dla komórek, oznaczając przeżywalność komórek w warunkach ekspozycji na każdy czynnik stresowy i wybierając warunki zapewniające wysoki poziom przeżywalności komórek.

Spośród wielu oryginalnych, interesujących wyników chciałbym wymienić ochronę przed stresem indukowanym przez nadtlenek wodoru przez fagocytozę melanosomów (w odniesieniu do fagocytozy kulek lateksu, Fig. 7), indukcję oksygenazy hemowej-1 w odpowiedzi na jednorazową ekspozycję na nadtlenek wodoru (zmiany większe po fagocytozie melanosomów niż komórek lateksu; Fig. 9), spadek poziomu oksygenazy hemowej-1 i peroksydazy glutationowej w odpowiedzi na stres nadtlenkowy indukowany przez oksydazę glukozową (zmiany większe w komórkach, które fagocytowały melanosomy niż w komórkach, które fagocytowały kulki lateksu (Fig. 12), podwyższenie poziomu oksygenazy hemowej-1 i obniżenie poziomu peroksydazy glutationowej (zmiany silniejsze w komórkach które fagocytowały melanosomy niż w komórkach, które fagocytowały lateks), indukcję oksygenazy hemowej-1 i ferrytyny w komórkach, które fagocytowały melanosomy wzbogacone w żelazo oraz zmiany markerów i widm EPR melaniny w melanosomach komórek pigmentowanych siatkówki związane ze starzeniem się (Fig. 25). Te ostatnie dane dotyczą wprawdzie analiz „tylko” 9 preparatów nabłonka pigmentowanego siatkówki; zrozumiałe są jednak trudności w uzyskaniu materiału ludzkiego, a uzyskane dane są wystarczające dla określenia charakteru zmian właściwości melaniny w funkcji wieku dawcy.

Interpretacja uzyskanych wyników nie zawsze jest łatwa, tym bardziej więc należy odnieść się do niej z uznaniem. Doktorantka przypisuje indukcję oksygenazy hemowej w wyniku fagocytozy wytwarzaniu nadtlenku wodoru podczas fagocytozy postulując, że większa odpowiedź komórek po fagocytozie melanosomów może być związana z uwalnianiem jonów żelaza z tych organelli.

Interesujące są różnice w odpowiedzi komórek na jednorazowe podanie nadtlenku wodoru i na ciągłą ekspozycję na ten związek w układzie zawierającym oksydazę glukozową. Niewątpliwie, jak zauważa Autorka rozprawy na s. 65, przedłużona ekspozycja na niższe stężenia nadtlenku wodoru wytwarzanego enzymatycznie jest lepszym modelem sytuacji, jaka może mieć miejsce *in vivo* niż jednorazowa ekspozycja na stosunkowo wysokie stężenie

tego związku.

Kilka uwag może nasuwać się podczas lektury *Wyników* pracy. Nieco brakuje mi dokumentacji mikroskopowej efektów fagocytozy i ilościowej oceny fagocytozy, zwłaszcza w przypadku fagocytozy melanosomów – ile melanosomów fagocytowały komórki i jaki był potem wewnątrzkomórkowy poziom melaniny w komórkach? Podobnie, warto byłoby scharakteryzować ilościowo wzbogacenie melanosomów, a następnie fagocytujących je komórek, w żelazo. Czy wzbogacenie melanosomów w żelazo nie wpływało na wydajność fagocytozy?

Bardzo podoba mi się dojrzała Dyskusja pracy. Mam jedynie marginalne pytanie dotyczące statusu Rycin D2 i D3: czy przedstawiają ona własne wyniki Autorki rozprawy? Jeśli tak, to konwencja nakazywałaby pokazanie jej w części pracy poświęconej przedstawieniu wyników, a nie w Dyskusji; jeśli nie, należałoby to zaznaczyć. „Dla porządku” dobrze byłoby określić poziom nadtlenu wodoru osiągany w hodowli komórek w układzie oksydazy glukozowej.

Podsumowaniem rozprawy jest krótki rozdział (7) wymieniający główne wyniki i wnioski z przeprowadzonych badań (*Key Results and Main Conclusions*).

Rozprawę oceniam wysoko zarówno w aspekcie koncepcji, jak i pod względem metodycznym. Należy też wspomnieć, że część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w postaci dwóch współautorskich artykułów w czasopismach *Investigative Ophthalmology and Visual Science* oraz *Pigment Cell and Melanoma Research*.

Rozprawa jest dobrze napisana i starannie zredagowana, a pomysłowa szata graficzna budzi uznanie. Moim obowiązkiem, jako recenzenta, jest zwrócenie uwagi na drobne usterki natury edytorskiej, których nie udało się Doktorantce uniknąć, ale muszę przyznać, że nie udało mi się ich znaleźć zbyt wiele.

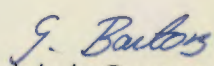
Jakość niektórych fotografii może budzić zastrzeżenia (przynajmniej w otrzymanym egzemplarzu rozprawy), np. Ryc. 1 i 5. Wartości odchylenia standardowego podane w Tab. 1 winny zapewne być pomnożone przez 10^5 . Dobrze byłoby nieco przemieścić rysunki tak, by ich legendy nie musiały wchodzić na następne strony rozprawy.

Wymienione uwagi polemiczne i nieliczne marginalne uwagi edytorskie nie rzutują na moją przedstawioną już bardzo pozytywną ocenę rozprawy.

Nie mam wątpliwości, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., wraz z późniejszymi zmianami.

Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr **Anny Piłat** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 31 maja 2013


Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz