

Białystok, 2015-08-28

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Zabiegło  
na temat „SLPI jako czynnik regulujący tworzenie i funkcje sieci neutrofilowych”**

Odkrycie zdolności neutrofilów do tworzenia zewnątrzkomórkowych sieci (NETs) dokonało przełomu w poglądach na temat biologii tych komórek. Okazało się bowiem, że zjawisko to występuje nie tylko w warunkach prawidłowych, ale też z różną intensywnością obserwowane jest w przebiegu procesów zapalnych, autoimmunizacyjnych czy nawet nowotworowych. Według wielu autorów proces tworzenia sieci NETs wydaje się odgrywać znaczącą rolę w ich patomechanizmie, stąd szerokie zainteresowanie tymi zagadnieniami wielu ośrodków badawczych na świecie. Należy do nich także zespół Pani Profesor Joanny Cichy, Kierownika Zakładu Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pierwsze interesujące obserwacje na temat NETs i autoimmunizacji, Pani Profesor przedstawiła na XIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej w Gdańsku 2011 roku. W ten kierunek badań wpisuje się praca doktorska mgr Katarzyny Zabiegło, zrealizowana pod kierunkiem Pani Profesor.

Kluczowym tematem rozprawy jest rola czynnika SLPI w regulacji tworzenia i funkcji zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w warunkach fizjologii oraz u chorych na łuszczycę.

W ciekawie przedstawionym wstępie Doktorantka omawia najważniejsze zagadnienia związane z powstawaniem, morfologią i biologiczną funkcją neutrofilów w oparciu o najnowsze doniesienia w tej dziedzinie. Za nowatorskie uważam uwzględnienie podziału populacji neutrofilów na tradycyjną pulę PMN oraz pulę neutrofilów niskiej gęstości LDG, które były przedmiotem badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy. Ważne też jest, z punktu widzenia tematu pracy, omówienie proteaz i ich inhibitorów występujących w neutrofilach, ze szczególnym uwzględnieniem inhibitora SLPI, który wykazuje także szeroki wachlarz różnorodnych funkcji pro- i anty-zapalnych. Na uwagę zasługuje również część poświęcona najnowszym teoriom na temat powstawania i roli sieci NETs, wzbogacona w bardzo ciekawe schematy, opracowane przez Autorkę w oparciu o najnowsze pozycje piśmiennictwa.

Na podstawie danych przedstawionych we wstępie Doktorantka formułuje założenia i cele pracy doktorskiej. Należy tu dodać, że badania stanowiące genezę pracy oraz część założonych celów badawczych została już zrealizowana i opublikowana w prestiżowych czasopismach.

Precyzyjnie została opisana część metodyczna, w której przedstawiono stosowane techniki badawcze i podano nawet dokładne specyfikacje zastosowanych odczynników. Doktorantka doskonale poradziła sobie z materiałem biologicznym różnego pochodzenia, co świadczy o jej szerokich zainteresowaniach i dużych umiejętnościach praktycznych.

Na uwagę zasługuje przedstawiona technika izolacji neutrofilów LDG oraz metody izolacji neutrofilów z tkanek, które mogą stanowić doskonały przewodnik dla innych badaczy. Jedyna uwaga dotyczy nieprawidłowego nazewnictwa testu t-Studenta, który w pracy określany jest jako test T-studenta.

Przedstawienie i opis wyników przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zasługuje na wyróżnienie. Obejmuje on nie tylko ich omówienie, ale też jednocześnie podsumowanie i wstępną interpretację, nadającą kierunek kolejnym badaniom, które były przez nią i innych członków zespołu konsekwentnie realizowane.

W części pierwszej na podstawie serii badań, obejmujących analizę w mikroskopie fluorescencyjnym oraz ocenę ilościową uwalnianego DNA, zidentyfikowała stężenie egzogenego inhibitora SLPI, o maksymalnym efekcie hamującym tworzenie sieci NETs przez zaktywowane przy pomocy TNF- $\alpha$ , PMA i *S. aureus* ludzkie neutrofile.

Kolejnym krokiem było zbadanie lokalizacji i mechanizmu działania SLPI, które wykazało, że inhibitor gromadzi się w jądrze zaktywowanych neutrofilów, gdzie hamuje proces degradacji histonu H4, powodując tym samym zahamowanie dekondensacji chromatyny i w efekcie blokując powstawanie NETs. Interesujące są obserwacje dotyczące zmutowanych form SLPI, które pozwoliły wykazać, że efekt hamowania NETs przez SLPI tylko częściowo zależy od hamowania NE i nie jest związany z indukcją reaktywnych form tlenu (ROS).

W dalszych badaniach z udziałem zwierząt Doktorantka stwierdziła, że neutrofile z genetycznym deficytem SLPI są bardziej wrażliwe na tworzenie NETs w warunkach *in vitro*, co potwierdziło wyniki uzyskane z zastosowaniem egzogenego SLPI.

Następnie, wykorzystując ludzkie neutrofile krwi obwodowej wykazała, że w następstwie aktywacji, endogenny SLPI współwystępuje z NE w ich jądrze i błonie komórkowej, a regulacja lokalizacji obu białek jest prawdopodobnie niezależna. Dodatkowe badania innych członków zespołu wykazały, że taka kolokalizacja obecna jest także w obrębie sieci NETs w skórze chorych na łuszczycę, choroby, w której obserwuje się nadprodukcję sieci NETs, co potwierdza przedstawiona dokumentacja zdjęciowa.

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka podjęła badania nad reaktywnością neutrofilów wobec SLPI i NE w łuszczycy, uwzględniając również populację komórek niskiej gęstości LDG. Punktem odniesienia były wyniki uzyskane w toczeniu rumieniowatym układowym (SLE). Szczególnie ważnym osiągnięciem na tym etapie badań było wykazanie, po raz pierwszy, 6-cio krotnego wzrostu populacji tych komórek we krwi obwodowej pacjentów i jednocześnie 10-cio krotnie wyższy ich udział w populacji komórek PBMC, w porównaniu do zdrowych dawców. Uwagę zwraca odmienna reaktywność populacji PMN i LDG w badanej grupie chorych, PMN wykazują podwyższoną reaktywność wobec NE i SLPI, natomiast niespodziewanie, aktywność komórek LDG nie różniła się w porównaniu z komórkami osób zdrowych.

W toku dalszej analizy wykazano, że komórki LDG w porównaniu z PMN cechuje większa reaktywność wobec NE i mniejsza wobec SLPI nie tylko u zdrowych dawców, ale też u chorych na łuszczycę. Według Doktorantki, następstwem tej sytuacji może być większa zdolność LDG do tworzenia NETs w badanej grupie pacjentów, co zostało potwierdzone w kolejnych badaniach. Na marginesie wspomnę, że Fig. 27 przedstawia komórki PBMC, a w opisie wymienia się populację LDG.

Na szczególną uwagę zasługuje ostatni etap badań. Stwierdzono, że neutrofile pochodzące ze skóry objętej zmianami łuszczycowymi cechuje wyższa reaktywność wobec NE sprzyjającej powstawaniu NETs i jednocześnie niższa wobec SLPI, inhibitora NE. Relacje między tymi białkami mogą być kluczową przyczyną wysokiej zdolności neutrofilów skórnych do tworzenia NETs.

Cenną częścią rozprawy jest niewątpliwie dyskusja, w której mgr Katarzyna Zabiegło dokonuje podsumowania swoich najważniejszych osiągnięć badawczych w świetle ich potencjalnego znaczenia w przebiegu infekcji o podłożu bakteryjnym i autoimmunizacyjnym.

Wyjaśnia m.in. mechanizm regulacji SLPI w procesie tworzenia sieci NETs, na drodze zależnej i niezależnej od NE. W drodze niezależnej od NE wskazuje na indukcję tego zjawiska poprzez szlak aktywacji związany z czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B. Podkreśla też różnice w reaktywności klasycznych PMN i komórek LDG wobec NE i SLPI, które mogą być przyczyną większej zdolności LDG do tworzenia sieci niż w przypadku PMN, zwłaszcza u chorych na łuszczycę.

Ciekawym fragmentem dyskusji jest część poświęcona roli NETs w indukcji procesów autoimmunizacyjnych na przykładzie toczenia rumieniowatego (SLE) oraz potencjalnego udziału elementów sieci w aktywacji komórek dendrytycznych, co w efekcie może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych.

Biorąc pod uwagę jednoczesną obecność NE inicjującej i inhibitora SLPI hamującego tworzenie sieci NETs, Doktorantka stawia najważniejsze pytanie o rzeczywistą rolę SLPI w regulacji sieci NETs w skórze chorych na łuszczycę i proponuje bardzo interesujący hipotetyczny model sugerujący jego dwukierunkowe działania: jako czynnika regulującego powstawanie sieci oraz regulującego jej funkcje. Zwraca jednocześnie uwagę na potencjalny udział keratynocytów w regulacji aktywności SLPI.

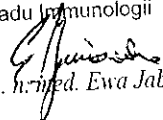
W części końcowej rozprawy mgr Katarzyna Zabiegło podsumowuje swoje dokonania i obserwacje w kontekście założonych celów badawczych, udowadniając, że w pełni je zrealizowała. I tak, jak to jest w przypadku osób o szerokiej wiedzy i bardzo zaangażowanych w pracę naukową, wyznacza kolejne kierunki badań i stawia pytania, które pozwolą wyjaśnić rolę inhibitora SLPI w regulacji tworzenia sieci NETs w chorobach autoimmunizacyjnych, na przykładzie łuszczycy.

Rozprawę mgr Katarzyny Zabiegło na temat „SLPI jako czynnik regulujący tworzenie i funkcje sieci neutrofilowych” oceniam bardzo wysoko. Oryginalny i nowatorski charakter, staranna szata graficzna i znakomita polszczyzna, stawia ją w gronie jednej z najlepszych rozpraw doktorskich, z którymi miałam przyjemność się zapoznać.

Podkreślić należy istotny aspekt poznawczy w dziedzinie biologii neutrofilów, szczególnie w procesach autoimmunizacji oraz potencjalne znaczenie praktyczne w rozwoju nowych kierunków immunoterapii, co zasługuje na wyróżnienie.

Wszechstronna znajomość tematu, umiejętność planowania i konsekwentnej realizacji badań, a także interpretacji uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki i świetnym przygotowaniu do dalszej pracy naukowej.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawione pracom doktorskim. W związku z powyższym, mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Zabiegło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Zakładu Immunologii  
  
prof. dr hab. h.c. med. Ewa Jabłońska