

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

### **Recenzja pracy doktorskiej**

Mgr Katarzyny Zabiegło pt: "SLPI jako czynnik regulujący tworzenie i funkcje sieci neutrofilowych".

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami poprzez proces fagocytozy, degranulacji ziarnistości oraz generacji wolnych rodników tlenowych i azotowych. Ostatnio opisano nowy mechanizm obronny granulocytów, zależny od tworzenia zewnątrzkomórkowych sieciopodobnych struktur złożonych ze zdekondensowanej chromatyny jądrowej oraz enzymów, nazwany *neutrophil extracellular traps (NETs)*. NET jest kluczowym elementem odporności nieswoistej, ale także źródłem antygenów i czynników prozapalnych, dlatego nieprawidłowości w tworzeniu lub degradacji tej struktury są powiązane ze wzrostem podatności organizmu na zakażenia i choroby zapalne. Wybór tematu pracy ma więc istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Starannie przygotowany maszynopis pracy liczy 130 stron, jest podzielony na 10 rozdziałów, opatrzony jest 33 czytelnymi rycinami, oraz 23 tabelami i zawiera zestawienie 175 pozycji piśmiennictwa.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu endogennego czynnika antyzapalnego - SLPI na proces formowania sieci *in vitro* przez neutrofile krwi obwodowej oraz *in vivo* w skórze łuszcycowej.

We wstępie Doktorantka przedstawiła informacje o rozwoju, budowie i funkcji granulocytów, opisując szczegółowo neutrofilowe proteiny serynowe: elastazę oraz katepsynę G i ich inhibitory, w tym SLPI. Autorka przedstawiła budowę i funkcję sieci neutrofilowych oraz genezę ich tworzenia, z uwzględnieniem poznanych elementów mechanizmu molekularnego. W końcowej części wstępu przedstawiona została rola neutrofilów oraz NETs w chorobach zapalnych, na przykładzie łuszczycy.

Wstęp dobrze uzasadniał genezę pracy doktorskiej. Praca doktorska jest częścią szeroko zakrojonych badań sieci granulocytarnych prowadzonych przez zespół Zakładu, z którego pochodzi Autorka.

W rozdziale „materiały i metody” wyczerpująco przedstawione zostały techniki laboratoryjne stosowane w pracy, metody izolacji granulocytów krwi obwodowej, skóry oraz szpiku kostnego myszy, przebieg procesu stymulacji komórek ludzkich i mysich oraz wizualizacji sieci, metody fluorymetryczne, cytometryczne, western blot i oceny wybuchu tlenowego.

Na podstawie eksperymentów badawczych Doktorantka stwierdziła, że SLPI hamuje, w sposób zależny od stężenia, tworzenie sieci neutrofilowych wyzwalanych przez PMA, gronkowca złocistego i TNF. Najsilniejsze hamowanie było obserwowane w hodowlach stymulowanych gronkowcem, w żadnym jednak przypadku blokada tworzenia sieci nie była całkowita. Hamujące działanie na tworzenie sieci przejawiał nie tylko natywny SLPI, ale także 3 mutanty tego białka różniące się aktywnością inhibitorową względem wybranych proteaz. W dodatkowo przeprowadzonych przez grupę badawczą eksperymentach wykazano, że wszystkie stosowane mutanty mają porównywalne działanie hamujące wzrost *S. aureus* oraz działanie bakteriobójcze. Inny badany inhibitor proteaz, alfa-1 antytrypsyna, nie wywierał działania hamującego na generację NET. Doktorantka wykazała również, że granulocyty myszy z genetycznie uwarunkowanym niedoborem SLPI są bardziej wrażliwe na wyrzut NET *in vitro* niż granulocyty myszy dzikich. Celem poznania mechanizmu hamującego działania SLPI na tworzenie sieci badano lokalizację komórkową SLPI. Doktorantka zauważyła że SLPI (podobnie jak jego mutanty) ma zdolność do migracji przez błonę komórkową neutrofilów i gromadzi się w cytoplazmie nieaktywowanych komórek. Kolejno wykazano, że w po aktywacji PMA zarówno NE jak i endogenne SLPI przemieszczają się do jądra komórki i kolokalizują zarówno w jądrze jak i w błonie komórkowej. Podobnie kolokalizację obu tych białek i dodatkowo DNA Doktorantka obserwowała w wyrzuconych sieciach, a także *in vivo* – w skórze w zmianach łuszcycowych. Kolejno, Doktorantka podjęła próbę odkrycia hamującego działania SLPI na tworzenie sieci, wykazując, że SLPI hamuje degradację histonów (osłabiona proteoliza histonu H4) w jądrze komórkowym neutrofilów. Proteolizę histonu H4 hamowały wszystkie mutanty SLPI choć różniły się aktywnością wobec elastazy. Z tej obserwacji doktorantka wyciągnęła słuszny wniosek, że oba te zjawiska są tylko częściowo ze sobą powiązane. Inny potencjalny mechanizm inhibitorowego działania SLPI na tworzenie sieci – generacja wolnych rodników tlenowych przez neutrofile stymulowane PMA, nie został potwierdzony w pracy.

Kolejną hipotezą badaną przez Doktorantkę była opinia, że w chorobach autoimmunizacyjnych, w których dochodzi do nadprodukcji sieci (na przykładzie łuszczycy), poziom SLPI może lokalnie ulec zmniejszeniu. Autorka porównała zawartość SLPI i NE w neutrofilach osób zdrowych i chorych na łuszczycę. Podobne obserwacje *in vivo*, w skórze łuszczycowej, prowadzone były przez innych członków zespołu. U niewielkiego odsetka neutrofilów w skórze oraz w sieciach zaobserwowano kolokalizację DNA/SLPI/NE. Kolejno próbowano potwierdzić hipotezę, że poziom SLPI względem NE może ulec zmniejszeniu w chorobach autozapalnych. Jako pierwszy krok porównano odsetek neutrofilów o niskiej gęstości (bardziej wrażliwych na tworzenie sieci) u chorych na łuszczycę i zdrowych dawców oraz chorych na SLE. Wykazano wzrost odsetka neutrofilów o niskiej gęstości we krwi chorych na łuszczycę, podobnie jak w SLE. Obie populacje neutrofilów, zarówno od osób zdrowych jak i chorych na łuszczycę, różniły się immunoreaktywnością w stosunku do NE i SLPI, jakkolwiek wzrost immunoreaktywności w stosunku do NE i spadek SLPI był istotny tylko w grupie chorych na łuszczycę. To zjawisko może tłumaczyć bardzo wysoki potencjał neutrofilów do tworzenia sieci w tej grupie chorych. Porównywane grupy były stosunkowo nieliczne (grupa kontrolna zdrowych liczyła jedynie 6 osób), co mogło być przyczyną braku znamienych różnic pomiędzy niektórymi grupami.

W zwięzłym rozdziale dyskusja Autorka ustosunkowała się do otrzymanych wyników w świetle doniesień innych autorów. Autorka podkreśla złożoność mechanizmów regulacyjnych i zależności pomiędzy wyrzutem sieci a NE i SLPI. Jednym z mechanizmów zależnych od SLPI mógłby być wpływ na enzymy proteolityczne degradujące histony jądrowe. Inny sugerowany mechanizm to wpływ na czynniki transkrypcyjne. Doktorantka stawia hipotezę, że SLPI najsilniej hamuje sieci w przebiegu zakażeń bakteryjnych, ale niezależnie od funkcji antybakteryjnych. Brak podobnego działania alfa-1 AT próbuje wiązać z innym rodzajem wiązania SLPI z NE niż alfa-1 AT. Doktorantka słusznie brała również pod uwagę możliwość blokowania stresu oksydacyjnego przez SLPI. Jednak tej hipotezy nie potwierdziła w niniejszej pracy. Autorka wnioskuje też, że zmiana stosunku NE do SLPI może być przyczyną większej wrażliwości neutrofilów o małej gęstości na tworzenie sieci. Doktorantka sugeruje istotną rolę tej małej subpopulacji komórek w chorobach autoimmunizacyjnych. Ma jednak świadomość konieczności potwierdzenia otrzymanych wyników testami wykrywającymi konkretne białko. W dyskusji dotyczącej udziału sieci w patogenezie łuszczycy, Autorka stawia hipotezę, że populacja neutrofilów o niskiej gęstości może mieć istotny udział w patogenezie zapalenia w zmianach łuszczycowych.

Bardzo ciekawym fragmentem dyskusji jest przedstawienie potencjalnych możliwości hamowania produkcji sieci jako działania antyzapalnego w chorobach autoimmunizacyjnych.

W pracy przedstawiono przegląd potencjalnych inhibitorów i ich docelowych punktów uchwytu. Jednym z takich potencjalnych endogennych inhibitorów jest SLPI. Doktorantka przedyskutowała zależności pomiędzy NETs a odpowiedzią swoistą limfocytów Th1 i Th17 w rozwoju zapalenia w chorobach autoimmunizacyjnych oraz udział antygenów sieciopochodnych w wyzwalaniu i podtrzymywaniu reakcji zapalnych. W dyskusji Doktorantka powołuje się na inne prace swojego zespołu. Zwieńczeniem dyskusji jest propozycja zintegrowanego modelu działania SLPI w powiązaniu z NETs w skórze w chorobach autoimmunizacyjnych. Doktorantka przedstawiła SLPI jako regulatora tworzenia i funkcji sieci. Zaproponowała również hipotetyczny model udziału SLPI w patogenezie łuszczycy. Pracę kończy krótkie podsumowanie połączone z wnioskami. Dla większej przejrzystości pracy warto byłoby jednak wyliczyć jeszcze raz główne wnioski w punktach.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Zaprezentowana praca jest odpowiedzią na logiczny ciąg zadawanych pytań dotyczących badanego zagadnienia oraz pytań pojawiających się stopniowo podczas realizacji eksperymentów badawczych. Niewątpliwie praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki i stanowi istotny wkład do nauki. Przedstawiona praca jest dowodem pracowitości, umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Świadczy o zdolności do samodzielnego rozwiązywania postawionych sobie celów badawczych, o umiejętności krytycznej interpretacji wyników badań na tle właściwie wykorzystanego piśmiennictwa naukowego oraz logicznego wnioskowania. Przedstawiona do oceny rozprawa niewątpliwie zachęca do kontynuowania badań dotyczących opisywanych problemów. Do najbardziej istotnych osiągnięć Doktorantki zaliczam właściwe powiązanie zagadnień doświadczalnych będących przedmiotem pracy z szerszym kontekstem poznawczym i klinicznym, a w szczególności ze złożonym obrazem procesów patofizjologicznych charakterystycznych dla odpowiedzi nieswoistej i chorób autoimmunizacyjnych. Warto podkreślić jest również nowatorstwo i oryginalność pracy, gdyż badania dotyczące powyższych zagadnień są bardzo nieliczne. Wyniki pracy warte są szerokiego rozpowszechnienia w środowisku naukowym. Dyskusyjne jest natomiast ewentualne stosowanie leków hamujących tworzenie sieci. Taka strategia, choć być może modyfikująca przebieg chorób autoimmunizacyjnych, może być jednak mieczem obosiecznym, czyniąc chorego bezbronnym wobec ciężkich zakażeń bakteryjnych. Przedstawiona do oceny praca doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia

W oparciu o przedstawioną analizę stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Zabiegło pt „SLPI jako czynnik regulujący tworzenie i funkcje sieci neutrofilowych” spełnia kryteria uprawniające do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Tym samym zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Katarzyny Zabiegło do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii praca pozwoliła na istotne pogłębienie istniejącej wiedzy o genezie tworzenia sieci i jej powiązaniu ze zjawiskami fizjologicznymi i patologicznymi, dlatego zwracam się także z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

Handwritten signature of Urszula Demkow in black ink.