GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel.: 58 349 14 60, 58 349 14 64
e-mail: bioch@gumed.edu.pl, www: bioch.gumed.edu.pl
Kierownik: Prof. dr hab. *Ryszard T. Smoleński*
tel. 58 349 14 62, e-mail: rt.smolenski@gumed.edu.pl

Gdansk, 10 maja 2019

Prof. dr hab. med. Zbigniew Madeja
Dziekan Wydziału Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

Recenzja pracy 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".

Na wstępie chciałbym zaznaczyć moją wysoka ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy. Problem którego dotyczy praca jak i wybór metodyki badawczej oraz jakość uzyskanych wyników są na najwyższym poziomie. Interpretacja i przedstawienie kontekstu uzyskanych wyników świadczą o biegłości i kompetencji Doktorantki w badanej tematyce. Praca jest również przygotowana bardzo dobrze pod względem redakcyjnym i ciekawie napisana.

Wstęp przedstawia bardzo szeroko zagadnienia związane z przemianami lipidów i patologicznymi aspektami tych przemian. W końcowej części wstępu szczegółowo omówione jest powstawanie i znaczenie wodoronadtlenków cholesterolu które są głównym obiektem badań.

Podstawowym problemem którego dotyczy praca jest lepsze zrozumienie procesu miażdżycowego które to zagadnienie stanowi najważniejsze wyzwanie współczesnej medycyny. Powiązanie tego procesu z cholesterolem jest znane od dziesiątek lat. Wiadomo też, że relacja ta jest złożona. Powstawanie i efekty zmienionych form cholesterolu mogą mieć tu kluczowe znaczenie. Praca doktorska nie tylko dostarcza dalszych dowodów na szczególnie toksyczne i aterogenne działanie wodoronadtlenków cholesterolu, lecz również proponuje mechanizm działania.

Zaburzenia transportu cholesterolu są kluczowym elementem w powstawaniu zmian miażdżycowych, a szczególne istotne są w makrofagach. Od początków badań nad miażdżycą znane są komórki piankowate powstające w wyniku przeładowania tych komórek cholesterolem i innymi lipidami. Frakcją lipoprotein która ma tu największe znaczenie są utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości (oxLDL). W skład oxLDL wchodzą różne formy utlenionych lipidów w tym cholesterolu, ale tylko wodoronadtlenki cholesterolu są oksydoredukcyjnie aktywne.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel.: 58 349 14 60, 58 349 14 64
e-mail: bioch@gumed.edu.pl, www: bioch.gumed.edu.pl
Kierownik: Prof. dr hab. *Ryszard T. Smoleński*
tel. 58 349 14 62, e-mail: rt.smolenski@gumed.edu.pl

Makrofagi posiadają efektywny mechanizm eksportu cholesterolu i pochodnych do akceptorów zewnątrzkomórkowych, takich jak apolipoproteina A-I (apoA-I) lub lipoproteina o dużej gęstości (HDL). Nazywane jest to zwrotnym transportem cholesterolu którego końcowym etapem jest dostarczenie cholesterolu do wątroby w celu jego usunięcia. Makrofagi posiadają wiele białek, które biorą udział w tym procesie. Obejmują one białka z grupy ostrych regulatorów steroidogenezy (StAR), które wiążą i transportują cholesterol, dostarczając go do mitochondriów.

W recenzowanej pracy doktorskiej wykazano, że białka StAR mogą przenosić do mitochondriów makrofagów nie tylko cholesterol, ale także powstające w warunkach stresu oksydacyjnego wodoronadtlenki cholesterolu, prowadząc do zaburzenia wczesnych etapów zwrotnego transportu cholesterolu. Po dostarczeniu do mitochondrium badany wodoronadtlenek cholesterolu - 7-OOH inicjował peroksydację lipidów powodując zaburzenie funkcji błony mitochondrialnej. Dostarczenie 7-OOH do mitochondriów makrofagów spowodowało również zmniejszenie ekspresji STARD1, redukcję produkcji 27-OH oraz zmniejszenie ekspresji białka ABCA1. Zmiany te doprowadziły do zmniejszenia eksportu cholesterolu i jego wiązania przez apoA-I i HDL.

Praca ta przedstawia nowe koncepcje dotyczące roli peroksydacji lipidów w dysfunkcji makrofagów oraz patogenezie miażdżycy który mogą stać się obiektem ukierunkowanych działań terapeutycznych.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej opierają się głownie o zastosowanie hodowli komórkowych ludzkiej linii makrofagów THP-1 oraz mysich linii RAW 264.7. Komórki poddawano transfekcji z zastosowaniem systemów Lipofektaminowych. Analizy w prowadzonych eksperymentach polegały głównie na ocenie zawartości białek z zastosowaniem Western Blot oraz na PCR w czasie rzeczywistym. Zastosowano techniki izotopowe do analizy transportu wodoronadtlenków cholesterolu, czy cholesterolu. Dokonano również pomiarów mitochondrialnego potencjału błonowego z zastosowaniem znacznika JC-1, oceny komórkowej peroksydacji lipidów, izolacji frakcji mitochondrialnej z komórek oraz pomiaru aktywności CYP27A1.

Jednym z głównych wniosków z przeprowadzonych badań jest wykazanie kluczowej roli białka STARD1 w transporcie 7-OOH do mitochondriów o czym świadczy:

Stymulacja Bu2cAMP powoduje wzrost ekspresji białek STARD1, ABCA1 lub STARD4 w ludzkich lub mysich makrofagach.

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel.: 58 349 14 60, 58 349 14 64
e-mail: bioch@gumed.edu.pl, www: bioch.gumed.edu.pl
Kierownik: Prof. dr hab. *Ryszard T. Smoleński*
tel. 58 349 14 62, e-mail: rt.smolenski@gumed.edu.pl

Zwiększona ekspresja STARD1 powoduje zwiększenie wychwytu 7-OOH przez mitochondria, natomiast wyciszenie STARD1 powoduje zmniejszenie jego wychwytu w obu liniach makrofagowych

Drugim głównym wnioskiem jest wykazanie, że badany wodoronadtlenk cholesterolu - 7-OOH dostarczony do mitochondriów makrofagów powodują dysfunkcję zwrotnego transportu cholesterolu. Wniosek ten wyciągnięto na podstawie następujących obserwacji:

Cytotoksyczność 7-OOH zależy od ekspresji STARD1 - jest wyższa w makrofagach stymulowanych Bu2cAMP (zwiększona ekspresja) a niższa po wyciszeniu STARD1.

Obecność białka STARD1 nie ma wpływu na cytotoksyczność nadtlenku tert-butylu w makrofagach.

Cytotoksyczność redoksowo aktywnych 7-OOH jest wyższa niż cytotoksyczność innych oksysteroli (7-OH i 7=O).

W stymulowanych Bu2cAMP makrofagach następuje spadek mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi m$) w porównaniu do niestymulowanej kontroli oraz obserwuje się zwiększony poziom peroksydacji lipidów (przede wszystkim w mitochondriach).

Makrofagi z wyciszonym STARD1 mają zmniejszony poziom peroksydacji w porównaniu do negatywnych kontroli wyciszenia.

Podanie 7-OOH makrofagom skutkuje zmniejszeniem aktywności CYP27A1, a także zmniejszeniem produkcji 27-OH.

W stymulowanych Bu2cAMP makrofagach THP-1 po zadziałaniu 7-OOH następuje zmniejszenie ekspresji białek STARD1, ABCA1 oraz ABCG1.

7-OOH zmniejsza eksport cholesterolu do apoA-1 oraz HDL w stymulowanych Bu2cAMP makrofagach THP-1.

Wyniki tych badan znalazły się w dwóch bardzo dobrych publikacjach w FEBS Letters i ATVB.

Pomimo dużej staranności w przygotowaniu pracy zauważyłem kilka literówek, np. w streszczeniu, l.12 „białka" jest powtórzone 2x. Chyba lepiej by było umieścić rozdział „Analiza dynamiki mitochondriów" jako część pracy a nie Suplement.

Jedyna ogólna uwaga jaka mogę mieć do przeprowadzonych badań to zastosowanie tylko jednego układu eksperymentalnego – hodowli komórkowych w dodatku tylko linii

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel.: 58 349 14 60, 58 349 14 64
e-mail: bioch@gumed.edu.pl, www: bioch.gumed.edu.pl
Kierownik: Prof. dr hab. *Ryszard T. Smoleński*
tel. 58 349 14 62, e-mail: rt.smolenski@gumed.edu.pl

komórkowych. Wprawdzie wyniki są bardzo przekonywujące i jest wysoce prawdopodobne że podobne mechanizmy funkcjonują „in vivo" na pewno warto by je zweryfikować z użyciem pierwotnych komórek, a jeszcze lepiej w materiale pobranym od pacjentów takich jak usuwane w trakcie zabiegów chirurgicznych fragmenty zmienionych miażdżycowo naczyń. Miałbym też pytanie na ile czynniki takie jak obecność erytrocytów i hemoglobiny może wpływać na przemiany i efekty wodoronadtlenków cholesterolu. Ciekaw jestem również jaki może być wpływ wodoronadtlenku cholesterolu na inne komórki np. śródbłonek czy komórki mięśniówki gładkiej? Czy wodoronadtlenki cholesterolu mogą wpływać na funkcję komórek bogatych w mitochondria takich jak kardiomiocyty?

Wspomniana uwaga i pytania do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości naukowej. Praca stanowi bardzo znaczący wkład w badania nad zrozumieniem mechanizmów miażdżycy. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria formalne stawiane rozprawie doktorskiej. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Wawak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński