



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii



Prof. dr hab. Nadzieja Drela
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
ndrela@biol.uw.edu.pl; n.drela@uw.edu.pl
Tel: 22 5541 126
Kom. 608 679 011

Warszawa, 16.09.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Grzegorza Guli pt.
„Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego”**
Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Patomorfologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

Prof. dr hab. Anna Ratajska

Zmiana paradygmatu pochodzenia makrofagów stanowi krytyczny krok w rozumieniu roli tych komórek w odpowiedzi odpornościowej, w powstawaniu i utrzymywaniu homeostazy narządów, a tym samym organizmu. Przez dziesiątki lat uważano, że tkankowe makrofagi pochodzą z monocytów krążących w krwi, a funkcja jaką im przypisywano ogranicza się głównie do fagocytozy, syntezy składników dopełniacza i białek stanu zapalnego. Taka koncepcja, jak dzisiaj byśmy powiedzieli, ograniczonej roli i pochodzenia makrofagów, została podważona już pod koniec lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku przez wyniki nielicznych wówczas badań i rozwinięta w latach 80-90-tych XX wieku. Wyniki badań z ostatnich 15 lat wielu zespołów badawczych wykazały, że makrofagi są pierwszymi komórkami odpornościowymi, które pojawiają się podczas rozwoju embrionalnego i są kluczowe we wczesnych stadiach rozwoju. Makrofagi tkankowe pełnią rolę w utrzymaniu homeostazy, gojeniu ran czy regeneracji tkanek. Za tę różnorodność funkcjonalną odpowiada zdolność do interakcji z innymi komórkami mikrośrodowiska tkanki i reagowania na substancje rozpuszczalne poprzez receptory błonowe, wewnątrzkomórkowe, ekspresję czynników transkrypcyjnych, modyfikację histonów i szereg innych zmian, w tym metabolicznych. Wiadomo już, że zaburzona funkcja makrofagów jest silnie związana z patogenezą wielu chorób. Wyniki badań ostatnich lat wskazują na celowość analizy fenotypowej populacji

makrofagów w środowisku nowotworu. Postuluje się nawet zależność skuteczności terapii, chemioterapii i radioterapii, od występowania określonych typów makrofagów.

W kontekście postępujących badań związanych z “odkrywaniem makrofagów na nowo” problematyka badawcza podjęta przez Autora rozprawy doktorskiej, pana Grzegorza Gulę, jest bardzo ważna zarówno w kontekście badań podstawowych jak i aplikacyjnych. Większość badań, z powodów etycznych, prowadzona jest z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, tak jak badania przedstawione w recenzowanej dysertacji. Powstaje oczywiście pytanie, czy pojawiające się koncepcje heterogeniczności makrofagów tkankowych dotyczących zarówno pochodzenia jak i funkcji, można przełożyć na ludzi? O odpowiedź na to pytanie, w kontekście wyników własnych i innych badaczy, prosiłabym Autora rozprawy.

Ocena merytoryczna dysertacji

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 59 stronach wszystkie wymagane rozdziały. Tytuł pracy „Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego” stanowiłby dobry podtytuł. Tytuł powinien określać treść pracy, mieć związek z jej celem, hipotezą badawczą i uzyskanymi wynikami badań. Ten tytuł odnosi się pośrednio do wniosków wypływających z uzyskanych wyników badań. Autor rozprawy już w streszczeniu określa cel pracy jako „zbadanie fenotypów, w tym markerów komórkowych, które były podstawą do wyodrębnienia subpopulacji makrofagów oraz wskazanie potencjalnych funkcji makrofagów w niektórych procesach morfogenezy serca. Charakterystykę populacji makrofagów uzupełniono badaniami progresji zasiedlania przez te komórki różnych obszarów serca podczas rozwoju prenatalnego”. Na podstawie charakterystyki fenotypowej określonej w oparciu o właściwie wybrane markery i lokalizację w narządzie można jedynie wnioskować o funkcji biologicznej, co też Autor rozprawy słusznie czyni. Jednakże, nie wykazuje doświadczalnie domniemanej funkcji. Podobny jest zresztą tytuł opublikowanego już przez Autora artykułu oryginalnego, ale ten rodzaj publikacji jest raportem z bieżących badań, coraz częściej zaopatrywanym w tytuły wzbudzające zainteresowanie redakcji, a rozprawa doktorska jest dziełem przedstawiającym podjętą problematykę badawczą, hipotezę sformułowaną na podstawie opublikowanych wyników własnych i innych badaczy i sposoby jej weryfikacji. Celem rozprawy jest weryfikacja hipotezy. Autor rozprawy prezentuje nowe podejście do klasyfikacji fenotypowej makrofagów serca płodowego proponując oryginalny zestaw markerów umożliwiających rozróżnienie tych komórek z jednoczesnym wskazaniem ich możliwych funkcji biologicznych związanych z udziałem w angiogenezie, limfangiogenezie i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. Punktem wyjścia dla badań łączących ekspresję określonych markerów z możliwą funkcją makrofagów płodowych serca jest zobrazowanie zasiedlania przez makrofagi różnych obszarów serca w określonym czasie rozwoju prenatalnego. W rozdziale Założenia i cel

pracy Autor określa 4 hipotezy badawcze nie przedstawiając sposobów weryfikacji każdej z nich. Z kolei celem pracy powinna być weryfikacja hipotez badawczych poprzez odpowiednio zaplanowane badanie z wykorzystaniem właściwej techniki badawczej. Autor rozprawy określa 2 cele badawcze, które służą weryfikacji hipotez, których można się domyśleć, ale nie są one całkiem zbieżne z tymi sformułowanymi wcześniej w tym samym rozdziale. Dalej, Autor stwierdza, że do weryfikacji hipotez zastosowano wybrane metody: a/ badania immunohistochemiczne *in situ*; b/ cytometrię przepływową; c/ RT-PCR. Tylko w przypadku ostatnim wyjaśnia w jakim celu stosuje tę metodę. Po przeczytaniu dwóch pierwszych rozdziałów, Wstęp i Założenia i cel pracy, odniosłam wrażenie, że Autor pisał je w pośpiechu, nie eksponując własnych, jak się okaże w kolejnych rozdziałach, oryginalnych pomysłów. Na szczęście, po przejściu do kolejnych rozdziałów: Wyniki i Dyskusja, z zainteresowaniem i pełnym uznaniem śledziłam logiczny, przemyślany na każdym etapie przebieg badań i doceniłam nowatorskie podejście do problemu badawczego. Opis wyników wraz z dokumentacją w postaci zdjęć i rycin jest zwięzły, jasny i wskazujący na logiczne planowanie kolejnych eksperymentów. Idąc za opisem Autora, można obserwować obecność pierwszych makrofagów serca w rozwoju embrionalnym, dokumentowanych metodą whole-mount, na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego, wyobrazić sobie ich możliwe funkcje biologiczne na podstawie rozmieszczenia blisko komórek śródbłonna naczyń, czy też nagromadzenia w obszarach intensywnej apoptozy. Wiele też wnioskujemy obserwując morfologię makrofagów wskazującą na interakcje z tworzącymi się naczyniami krwionośnymi. Następnie, Autor przedstawia i analizuje nową, nieprzypadkową i nowatorską, klasyfikację makrofagów serca płodowego uwzględniającą poziom ekspresji CD64 i ich zróżnicowanie pod względem występowania receptora mannozy, CD206, charakterystycznego dla makrofagów M2. W wyróżnionych populacjach makrofagów obserwujemy ekspresję mRNA dla genów związanych z procesami powstawania naczyń krwionośnych i limfatycznych i przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Autor rozprawy podkreśla, że żaden z badanych wskaźników (mRNA dla wybranych genów, obecność określonych białek powierzchniowych czy wewnątrzkomórkowych) nie może być zastosowany do definiowania funkcji biologicznej, natomiast może wskazywać na możliwość jej pełnienia.

Pan Grzegorz Gula bardzo dobrze wybrał metody badań do założonego celu pracy (jak wspomniałam wcześniej bardziej domyślnego niż wyrażonego wprost). Samo pozyskiwanie materiału do badań jest trudne, zważywszy że liczba makrofagów na liście komórek zawartych w mięśniu sercowym zajmuje końcowe miejsce. Zastosowano różnorodne techniki badawcze: badania immunohistochemiczne *in situ*, cytometrię przepływową, RT-PCR. Wszystkie metody zostały opisane bardzo szczegółowo, co umożliwi ich wykorzystanie przez innych badaczy. Dokumentacja uzyskanych wyników jest bardzo szczegółowa. Wyniki przedstawiono na 11 rycinach bardzo dobrej

jakości, przedstawiających obrazowanie komórek z mikroskopu stereoskopowego, konfokalnego, cytometru przepływowego oraz ryciny przedstawiające poziomy ekspresji mRNA dla poszczególnych genów wybranych populacji makrofagów.

Autor rozprawy, słusznie zauważa, że większość badaczy skupia się na analizie fenotypowej makrofagów zarówno serca płodowego jak i postnatalnego wskazującej na ich pochodzenie. Chociaż ostatnie lata charakteryzuje zmiana podejścia do przedmiotu badań i ukierunkowanie na badanie funkcji makrofagów w zależności od ich lokalizacji w tkance, chociażby rolę makrofagów wsierdza w powstawaniu zastawek i inne wymienione w rozprawie. Większość tkanek w ciele zawiera rezydujące makrofagi, które wykazują zróżnicowanie fenotypowe specyficzne dla tkanki i niszy. Autor rozprawy poszukuje zależności między heterogenicznością fenotypową a lokalizacją w tkance i wpływem rezydentnego mikrośrodowiska tkankowego bardziej niż zróżnicowaniem pochodzenia. Dodatkowo, makrofagi płodowe charakteryzuje duża plastyczność zależna od czynników mikrośrodowiska. Stąd też pochodzi duże zainteresowanie tymi komórkami ze względu na potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Czy Autor rozprawy, zważywszy aktualny stan wiedzy w zakresie realizowanej problematyki badawczej, jest gotowy na kontynuację badań z wykorzystaniem modeli inżynierii tkankowej? Na jakie pytania szukałby Pan odpowiedzi konstruując taki model? Jaką rolę odgrywają czynniki parakryne w modelach inżynierii tkankowej? Jak je wybrać?

Uwagi formalne

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na przykłady nieprawidłowego nazewnictwa. Sztandarowym przykładem jest stosowanie terminu „układ immunologiczny” zamiast „układ odpornościowy”. Immunologia (ang. Immunology) jest dziedziną nauki zajmującą się badaniem układu odpornościowego (ang. Immune system, a nie „immunological system”), analogicznie do neurologii zajmującej się badaniem układu nerwowego (ang. Nervous system, a nie „neurological system”), pulmonologii (ang. Pulmonology) – układu oddechowego (ang. Respiratory system, a nie „pulmonological system”), itp. Przyznaję, że jest to powszechnie stosowany żargon, ale nie prawidłowa nazwa. Niefortunny jest tytuł ryciny 9: „Analiza FACS”. Nie można analizować urządzenia czy metody. Tym razem technika cytometrii posłużyła do analizy markerów makrofagów. Niektóre zdania, jak to na stronie 21 wprowadzają czytelnika w błąd lub przynajmniej zakłopotanie: „Wyodrębnione na podstawie wiązania przeciwciał subpopulacje makrofagów wykazywały potencjalnie różne funkcje związane z procesami angiogenezy, limfangiogenezy czy przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej”. Komórki wyodrębnia się na podstawie charakterystycznych markerów, a wiązanie swoistych przeciwciał umożliwia ich identyfikację. Komórki nie mogą wykazywać potencjalnie różnych funkcji. Mogą wykazywać różne funkcje, ale

te nie były badane. Na podstawie charakterystycznych markerów można wnioskować o potencjalnej funkcji, a nie jej wykazaniu. Punkt 6 w rozdziale Podsumowanie i wnioski jest następujący: „W badaniach cytometrii przepływowej zidentyfikowano nowy, dotychczas nieopisywany podział makrofagów płodowych w oparciu o ekspresję markerów CD64 i CD206: CD64^{low} ; CD64^{high} CD206⁻ oraz CD64^{high} CD206⁺”. Nie badano cytometrii, tylko wykorzystano tę technikę badawczą do analizy zaplanowanych markerów. Nie zidentyfikowano nowego podziału makrofagów płodowych, tylko zaproponowano nową klasyfikację tych komórek na podstawie wybranych markerów. Całkowicie pomijam błędy edytorskie, które nie przytrafiają się tylko tym, którzy nie piszą.

Wniosek końcowy

Badania i ich wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zrealizowano ze środków projektu Diamentowy Grant, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (DI 2012 014642), pt. „Czy komórki serca perinatalnego myszy o fenotypie Lyve-1⁺/CD31⁻ wykazują potencjał proangiogeny/ prolimfangiogeny? Badania porównawcze z użyciem tożsamyh subpopulacji komórek krwi obwodowej”, którego kierownikiem był pan Grzegorz Gula. Dodatkowe źródła finansowania stanowiły mini-granty Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (1M11/NM1/13 oraz 1M11/NM1/15).

Wyniki badań będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o wysokim IF, w kolejności w wykazie 4,304 i 3,582 za rok 2020:

1. Gula G., Rumiński, S., Niderla-Bielińska, J., Jasińska, A., Kiernozek, E., Jankowska-Steifer, E., Flaht-Zabost A., Ratajska, A. (2021). Potential functions of embryonic cardiac macrophages in angiogenesis, lymphangiogenesis and extracellular matrix remodeling. *Histochemistry and Cell Biology*, 155(1), 117-132.
2. Gula G., Ratajska A. (2022) Novel insights into embryonic cardiac macrophages. *Developmental Biology* 488:1-10. doi: 10.1016/j.ydbio.2022.05.003. Online ahead of print.

Według mojej oceny, praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Składam do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie pana Grzegorza Guli do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy zatytułowanej „Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego”.

Dorobek Autora dysertacji został już oceniony pozytywnie, a wyniki badań jako interesujące i nowatorskie zostały docenione przez redakcję czasopism naukowych.

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ((Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm. – tekst

ujednolicony D.U. z dnia 2 grudnia 2014 r. poz. 1852) oraz Rozporządzenie MNiSzW z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Jednocześnie, ze względu na wartość naukową badań, profesjonalną dokumentację wyników, a także dojrzały naukowo ich opis i dyskusję, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana Grzegorza Guli.



/prof. dr hab. Nadzieja Dreła/