

mgr Agata Braniewska

**Zbadanie pobierania hemoglobiny przez makrofagi
i jej przekazywania komórkom nowotworowym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz Rygiel

Zakład Immunologii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Warszawa 2021 r.



Streszczenie w języku polskim

Hemoglobina (Hb) to białko zawierające żelazo, które bierze udział w transporcie tlenu oraz dwutlenku węgla. Hb pełni swoją fizjologiczną funkcję wewnątrz erytrocytów, natomiast wolna Hb wykazuje właściwości prooksydacyjne i prozapalne. Z tej przyczyny, aby zapobiec negatywnym skutkom obecności wolnej Hb, w organizmie istnieje swoisty system detoksykacyjny: pozakomórkowa Hb jest wiązana przez osoczowe białko – haptoglobinę, a następnie wychwytywana przez receptor CD163 na makrofagach, gdzie Hb jest degradowana do aminokwasów, tlenu węgla, żelaza i bilirubiny. Stanowi to podstawowy sposób przetwarzania Hb w makrofagach. W badaniach naszego zespołu zaobserwowano nowy sposób procesowania Hb, który polega na transferze Hb z makrofagów do innych komórek, w tym komórek nowotworowych.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja pobierania Hb przez makrofagi, scharakteryzowanie nieopisanego do tej pory zjawiska transferu Hb oraz zbadanie mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Większość eksperymentów przeprowadzono na makrofagach różnicowanych z monocytarnej linii THP-1 oraz liniach nowotworowych MDA-MB 231 i SKOV3, wykorzystywano również ludzkie makrofagi różnicowane z monocytów krwi, mysie makrofagi różnicowane z komórek szpikowych oraz linię RAW264.7

Uzyskane wyniki wskazują, że spośród jednojądrzastych komórek krwi Hb była pobierana wyłącznie przez monocyty krwi. Wszystkie badane makrofagi – ludzkie oraz mysie, pierwotne komórki oraz ustalone linie komórkowe – pobierały Hb. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że pobieranie Hb przez makrofagi może przebiegać bez udziału haptoglobiny i receptora CD163.

Przekazywanie Hb z makrofagów do komórek nowotworowych zaobserwowano przy użyciu cytometrii przepływowej, mikroskopii konfokalnej oraz spektroskopii korelacji fluorescencji. Wszystkie badane makrofagi przekazywały Hb do komórek nowotworowych. Proces przekazywania Hb narastał w czasie. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że przekazywanie Hb jest procesem unikatowym dla białka, ponieważ inne białko pobierane przez makrofagi – surowicza albumina bydlęca – nie było przekazywane do komórek nowotworowych. Ponadto, Hb była przekazywana między makrofagami, co świadczy o tym, że transfer Hb nie jest selektywny pod względem komórek nowotworowych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej wykluczono zaangażowanie tunelujących nanorurek w przekazywaniu Hb. Wykazano udział mechanizmu sekcyjnego – Hb była przekazywana przez medium hodowlane. Ostatecznie udowodniono, że Hb jest wydzielana przez makrofagi w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, które są pobierane przez komórki nowotworowe.

Wydaje się, że wydzielanie Hb przez makrofagi może być zaangażowane w proces gospodarki żelazem. Alternatywnie, uwalnianie Hb z makrofagów naładowanych tym białkiem może być mechanizmem chroniącym komórkę przed ferroptozą, czyli śmiercią zależną od żelaza. Mechanizm przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych można wykorzystać w komórkowej terapii przeciwnowotworowej, w której lek będzie przyłączony do Hb, w takiej formie załadowany do makrofagów, a następnie podany choremu. W potencjalnej terapii makrofagi migrujące do guza nowotworowego przekażą lek skoniugowany z Hb do komórek nowotworowych.

Podsumowując, w niniejszej pracy opisano nowe zjawisko przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zaobserwowanie tego nieznanego do tej pory procesu skłania do kontynuowania badań nad metabolizmem Hb.