



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

dr hab. Elżbieta Kołaczowska, prof. UJ
Zakład Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48-12) 664-50-65
E-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl

Kraków, 26 stycznia 2020

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Anety MANDA-HANDZLIK pt.

„Rola reaktywnych form azotu w tworzeniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych”

Odkrycie neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET) było jednym z najbardziej zaskakujących odkryć pierwszej dekady XXI wieku w dziedzinie immunologii. Zaskakującym, gdyż nie było to odkrycie pojedynczego etapu danej reakcji czy nowego białka, ale całego mechanizmu służącego do eliminacji patogenów i ograniczenia rozprzestrzeniania się infekcji, a ponadto, co odkryto dopiero w ciągu ostatnich lat, odpowiedzialnego za etiologię i/lub patologię wielu chorób nie tylko o charakterze zakaźnym, ale także autoimmunologicznym i nowotworowym. W ciągu 15 lat, które upłynęły od odkrycia NET poznaliśmy już niektóre z mechanizmów odpowiedzialnych za ich tworzenie oraz, przynajmniej niektóre, szlaki indukcji tworzenia sieci, niemniej jeszcze ciągle istnieje bardzo wiele niewiadomych, a także opublikowano wiele kontrowersyjnych, często ze sobą sprzecznych, doniesień na ich temat. Z pewnością badania nad wyrzutem NET przez neutrofile są także przykładem tego jak różne wyniki mogą generować badania *in vitro* czy *ex vivo*, w przeciwieństwie do badań *in vivo*. To te ostatnie wykazały przeżyciowy charakter wyrzutu NET, jako jeden z potencjalnych szlaków ich tworzenia, oraz wykazały ograniczenia w stosowaniu DNazy do usuwania NET w organizmach zwierzęcych i ludzkich. Niemniej to badania *in vitro* często pozwalają na bardziej szczegółowe poznanie mechanizmów i to właśnie badania o takim charakterze prowadziła Pani mgr Aneta Manda-Handzlik. Obecnie wiemy, że oprócz pozytywnej roli, zwłaszcza na pierwszych etapach infekcji, jaką odkrywają wychwytyjące patogeny NET (*yang*), ich niepoprawne bądź odsunięte w czasie usuwanie prowadzi do uszkodzenia tkanek własnych (*yin*). Zatem istnieje potrzeba stworzenia terapii, które

umożliwiłyby kontrolowanie tworzenia i/lub usuwania NET, a pierwszym, krytycznym krokiem do ich stworzenia jest poznanie szczegółowych mechanizmów wyrzutu NET. Dotychczas, zwłaszcza w badaniach *in vitro*, wykazano bardzo istotne zaangażowanie w indukcję tworzenia NET reaktywnych form tlenu (ROS), podczas gdy neutrofile generują także reaktywne formy azotu, które odgrywają ważną rolę w zwalczaniu infekcji, ale także funkcjonowaniu samych neutrofilii. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, nie jest zatem zaskakującym, że Doktorantka skoncentrowała swoje badania na bardzo szczegółowym poznaniu mechanizmów powiązanych z generowaniem, bądź działaniem, reaktywnych form azotu w wyrzucie NET.

Cele badań zostały szczegółowo opisane, choć zabrakło jasno sformułowanej hipotezy badawczej. Niemniej jej elementy pojawiają się w oryginalnych publikacjach stanowiących integralną część pracy doktorskiej.

Przedmiot podjętych badań jest bardzo ważny i niesłychanie aktualny, biorąc pod uwagę znaczenie neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET) w funkcjach obronnych organizmu, a także w indukcji bądź przebiegu licznych chorób człowieka.

W tym miejscu pragnę wyraźnie podkreślić, że dysertacja Pani Manda-Handzlik realizowana była w ramach projektu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki, którego była kierownikiem, oraz grantów Powroty (FNP/UE) oraz Iuventus (MNiSW), w których była wykonawcą. Natomiast, otrzymane wyniki zostały opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach naukowych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej o wysokim współczynniku przebiccia (3.947 i 7.014) oraz po 140 pkt według aktualnej punktacji MNiSW. Co bardzo ważne, w obu doktorantka jest pierwszym autorem, a zatem, zarówno same projekty, jak i wyniki uzyskane w ramach ich realizacji, zostały już ocenione przez niezależnych specjalistów.

Dysertacja ma układ rozprawy doktorskiej składającej się opublikowanych (dwóch) oryginalnych artykułów naukowych opatrzonych Wstępem oraz Podsumowaniem/Wnioskami, liczy 105 stron, 100 pozycji cytowanej literatury, wśród których ponad połowa pochodzi z ostatnich 5 lat. Pracę rozpoczyna dobrze napisany Wstęp. Autorka wprowadza czytającego w tematykę badań, charakteryzuje neutrofile, przedstawia historię odkrycia NET, ich budowę i dotychczas poznane mechanizmy tworzenia. Opisuje także procesy autofagii oraz tworzenia i roli zarówno tlenowych jak i azotowych rodników tworzonych przez neutrofile. Należy podkreślić, że doktorantka bardzo umiejętnie opisuje poszczególne mechanizmy tworzenia NET, w tym te najbardziej kontrowersyjne, wzbudzające gorące dyskusje specjalistów zajmujących się sieciami. Po raz pierwszy czytałam opracowanie młodego naukowca, w którym tak umiejętnie przedstawiono różne punkty widzenia. Sposób ich przekazu powinien zadowolić każdą, nawet najbardziej opozycyjną ze stron. Moje szczegółowe uwagi do Wstępu są następujące:

- nieco niezręcznie napisano, że po 13-19 godzinach od pojawienia się we krwi neutrofile migrują do tkanek. Po pierwsze, jeżeli nie zaistnieje reakcja zapalna, nigdy nie opuszczają krwi, a po tym czasie są usuwane, zazwyczaj po wtórnej rekrutacji do szpiku kostnego. Po drugie, neutrofile są rekrutowane do tkanek po zaistnieniu bodźca o charakterze immunologicznym, bez względu na to którą godzinę znajdują się we krwi.

- na stronie 15 doktorantka wspomina, że mikroorganizmy są chwytywane w „lepką sieć”, w domyśle taką siecią są NET. Zgadając się z tą myślą, chętnie usłyszę komentarz doktorantki na temat tego jakie zjawisko chemiczne stoi za ową lepkością i których elementów sieci dotyczy ono w szczególności,

- uważam, że nie było potrzeby szczegółowego opisywania typów autofagii skoro tworzenie NET nie zostało dotychczas powiązane z żadną z nich w szczególności; a już zwłaszcza gdyby ostatecznie potwierdził się całkowity brak zaangażowania tego procesu w tworzenie sieci

- zabrakło mi wspomnienia o możliwości tworzenia ET, zewnątrzkomórkowych pułapek (ang. *extracellular traps*), przez inne granulocyty, a także monocyty (tylko raz wspomniano eozynofile). Nawet jeżeli praca doktorska poświęcona jest neutrofilowym ET, informacja o innych leukocytach nie tylko wzbogaciłaby Wstęp, ale także podkreśliła uniwersalność, a zatem i znaczenie tworzenia pułapek.

- strona 17; Opisując wpływ wielkości induktora sieci na ich tworzenie, doktorantka zaznacza, że „rolę sensora pozwalającego granulocytom wykryć wielkość patogenu pełni białko ziarnistości - NE” co uważam za niezręczne. To gdzie znajduje się (przemieszczająca się) elastaza neutrofilowa determinuje czy neutrofil będzie raczej fagocytował czy wyrzucał NET, jednak sama NE w żaden sposób nie uczestniczy w szacowaniu wielkości patogenu.

- strona 18; kontynuując rozważania na temat wpływu wielkości patogenu na zdolność do indukcji NET doktoranta używa sformułowania „małe mikroorganizmy” lub „małe bakterie”. W istocie nie chodzi o rozmiar patogenu (zwłaszcza bakterii) *per se*, ale o to czy komórki patogenów występują pojedynczo czy też agregują. Rozmiar jako taki ma znaczenie w przypadku grzybów: pojedynczych komórek lub strzępków grzybni.

- za bardzo ważne uważam zwrócenie uwagi na wycofanie z obiegu terminu NEToza, bądź bardzo ograniczone jego używanie, tylko w przypadku potwierdzonej eksperymentalnie/farmakologicznie śmierci komórki. Warto byłoby w tym miejscu zacytować także ustalenia Komitetu do Spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej z 2018 roku.

- strona 27, punkt 4.2.6 pierwsza część tego rozdziału nie została opatrzona cytacjami.

- uważam, że we Wstępie powinna zostać umieszczona charakterystyka linii HL-60.

Wstęp kończą ambitne, jasno sformułowane założenia i cele pracy. Jak wspomniano powyżej, w tej części pracy powinna także znajdować się hipoteza, bądź hipotezy badawcze.

Wyniki przedstawione są w formie przedruku oryginalnych prac badawczych wraz z materiałem uzupełniającym (tzw. *Supplementary data*). Zostały one opublikowane w dwóch bardzo dobrych czasopismach immunologicznych, a zatem były już poddane rygorystycznej ocenie recenzentów oraz redaktora prowadzącego. Zatem ograniczę się do opisu najważniejszych, w mojej ocenie, wyników oraz przedstawię swoją opinię o niektórych eksperymentalnych aspektach prac. Chciałabym równocześnie zaznaczyć, że w pracach zastosowano bardzo liczne metody badawcze z obszaru biologii komórki, biologii molekularnej i testy *stricte* immunologiczne. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że wszystkie wyniki uzyskano badając ludzkie neutrofile, a w jednej z prac analizowano także materiał ludzki pozyskany od pacjentów z przewlekłą chorobą ziarniniakową (CPG).

Pierwsza z prac zawiera wynik dotyczące próby wyprowadzenia, czy też udoskonalenia, metody pozyskiwania linii komórkowej do badania NET w warunkach *in vitro*. Badania te zostały bardzo rzetelnie przeprowadzone, a ich przedmiotem było zbadanie jakie czynniki różnicujące doprowadzą do postania dojrzałych neutrofilii z linii HL-60 (ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej) generujących efektywnie NET. Wyniki wskazują, że spośród testowanych czynników DMF jest najbardziej efektywny. Jednak komórki, które powstają w wyniku jego działania są morfologicznie odmienne od dojrzałych ludzkich neutrofilii, a ponadto nie tworzą NET pod wpływem reaktywnych form azotu, co wykazano w drugiej z publikacji. Choć uważam ten artykuł za bardzo istotny, równocześnie uważam, że do tworzenia NET przez zróżnicowane komórki HL-60 powinny być także użyte immunostymulanty biologiczne, endogenne (np. cytokiny czy chemokiny) oraz te związane z patogenami (ich fragmenty, takie jak LPS, lub całe komórki bakteryjne). Bardzo istotną wartością tego artykułu jest równoczesne przebadanie trzech najważniejszych stymulantów różnicowania linii HL-60 pod kątem zdolności do produkcji NET przez zróżnicowane komórki dojrzałe. Dotychczasowe, nieliczne, doniesienia koncentrowały się tylko na pojedynczych induktorach.

Druga z prac jest z pewnością najważniejszym (dotychczasowym) osiągnięciem doktorantki. W pracy tej zawarto ogromną liczbę wyników, ważnych wyników, jednoznacznie wskazujących, że reaktywne formy tlenu indukują, bądź modulują tworzenie NET. Wyjaśniono także zaangażowanie kinazy PI3K w ten proces. Ponadto wykazano, że dezintegracja jądra pod wpływem RFA jest wynikiem selektywnej degradacji histonów H2A i H2B, którą mediuje elastaza neutrofilowa. Nie wykazano natomiast powiązania pomiędzy indukowaniem NET, a cytrulinacją histonów. W przypadku zastosowania biologicznych stymulantów NET w ogóle nie stwierdzono zwiększonej produkcji tlenu azotu/reaktywnych form azotu w stosunku do neutrofilii niczym niestymulowanych. Jak w świetle tych

wyników doktorantka interpretuje znaczenie wyników uzyskanych po stymulacji substancjami syntetycznymi? Zgadzam się, że badania z zastosowaniem PMA i jonoforu wapnia (IC) były, i dalej są, ważne dla poznania mechanizmów tworzenia NET, ale ostatecznie rozchodzi się o poznanie mechanizmów, które działają endogennie w organizmie człowieka.

Reasumując uważam, że logicznie zaplanowane i konsekwentnie przeprowadzone eksperymenty, przyniosły rezultaty, które doktorantka opisała w jasny i szczegółowy sposób w publikacjach będących integralną częścią rozprawy doktorskiej.

Rozprawa kończy się dwu i pół stronicowym rozdziałem „Podsumowanie i wnioski”, który był dla mnie najbardziej rozczarowującą częścią rozprawy. Uważam, że bardziej adekwatna byłaby Dyskusja, która nie musiałaby przekraczać kilku zaledwie stron, ale jednak pozwoliłaby na równoległe przedyskutowanie wyników zawartych w obu publikacjach, na tle najnowszej literatury, być może takiej która ukazała się już po publikacji obu artykułów. Niemniej, w każdym z artykułów przedstawiono bardzo szczegółowe rozdziały Dyskusja, które uważam za bardzo dobrze napisane. Są one nie tylko dobrze i dojrzałe napisane, ale także logicznie i krytycznie przeprowadzone w oparciu o dobrze dobraną, aktualną literaturę przedmiotu. Chciałbym wyraźnie podkreślić, że Doktorantka opublikowanymi wynikami swojej pracy osiągnęła zamierzone cele, a przedstawione wyniki zostały poddane krytycznej analizie.

Jeżeli chodzi o techniczną stronę rozprawy doktorskiej to należy podkreślić, że jej strona edytorska jest bardzo precyzyjna i staranna. Czytając pracę nie spotkałam rażących błędów, czy niezręczności językowych. Jest zaledwie kilka przykładów tłumaczeń wprost z języka angielskiego. Moje jedyne uwagi to:

- Ryc. 1 – brak jest informacji o autorstwie zdjęć. Zapewne wykonała je sama doktorantka, ale taka informacja powinna znaleźć się w legendzie ryciny
- należałoby rozważyć czy używanie określenia „NETs” na liczbę mnogą NET w polskojęzycznym zapisie jest zasadne
- rozwinięcia nazw angielskich nie są zapisane kursywą.

Te drobne błędy, które z obowiązku recenzenta wyliczam, w żaden sposób nie wpływają, na moją wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy. Moim zdaniem uzyskane przez doktorantkę wyniki, będące efektem solidnie i logicznie zaplanowanych badań oraz konsekwentnie, systematycznie przeprowadzonych doświadczeń, w istotny sposób uzupełniają i poszerzają istniejącą wiedzę na temat mechanizmów formowanie neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy 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 póź. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z póź. zm.) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Anety Manda-Handzlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę duży zakres przeprowadzonych badań, ich trudność i wyzwania metodologiczne, oraz znaczenie badań dotyczących mechanizmów tworzenia zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych dla potencjalnego tworzenia terapii chorób ludzkich, a także fakt opublikowania uzyskanych wyników w dwóch bardzo dobrych pierwszo-autorskich publikacjach, uważam, że praca doktorska Pani mgr Anety Manda-Handzlik zasługuje na wyróżnienie.

dr hab. Elżbieta Kołaczowska, prof. UJ

Kierownik
Zakładu Hematologii Eksperymentalnej
Uniwersytetu Jagiellońskiego


dr hab. Elżbieta Kołaczowska