

Białystok, 12 luty 2020r.

Prof. dr hab. Ewa Jabłońska  
Zakład Immunologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Mandy-Handzlik  
pt. „Rola reaktywnych form azotu w tworzeniu zewnątrzkomórkowych sieci  
neutrofilowych”**

Tematem rozprawy doktorskiej mgr Anny Mandy-Handzlik jest zjawisko formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) na drodze NETozy, którego odkrycie dokonało ogromnego przełomu w poglądach na temat biologii neutrofilów. Mimo wielu lat badań prowadzonych przez różne ośrodki, proces ten nie został w pełni poznany. Biorąc pod uwagę dane wskazujące na niejednoznaczną rolę tych struktur w prawidłowej, a także zmienionej odpowiedzi immunologicznej, podejmuje się kolejne próby poznania przyczyn, podstaw molekularnych i możliwości regulacji ich uwalniania.

Sieci NETs, zawierające liczne białka, enzymy i materiał genetyczny pełnią niezaprzeczalnie korzystną rolę obronną w walce z patogennymi mikroorganizmami, poprzez ich wychwytywanie i eliminację. Z drugiej strony, w przypadku nadmiernego uwalniania tych struktur bądź ich upośledzonego klirensu, mogą one sprzyjać rozwojowi chorób o podłożu zapalnym, m.in. chorób autoimmunizacyjnych, zakażeń o ciężkim przebiegu czy miażdżycy. Poza tym udowodniono rolę sieci w procesie nowotworowym, które z jednej strony eliminują komórki nowotworowe, z drugiej zaś mogą sprzyjać rozwojowi nowotworów, m.in. ułatwiając powstawanie ognisk wtórnych.

W związku z powyższym, poznanie czynników indukujących formowanie sieci NETs i mechanizmów ich działania, stanowi obecnie jedno z ważnych wyzwań w zakresie badań zarówno podstawowych, jak i klinicznych.

W ten nurt badań z powodzeniem wpisuje się podjęty przez Doktorantkę temat dotyczący oceny mało poznanej roli reaktywnych form azotu (RFA), które obok reaktywnych

from tlenu (RFT), aktywności białek cytoplazmatycznych oraz zjawiska autofagii, są zaangażowane w proces powstawania sieci NETs.

Rozprawę doktorską mgr Anny Mandy-Handzlik stanowią 2 prace opublikowane w prestiżowych czasopismach o łącznym IF= 10,961.

Obszerny wstęp, uwzględniający najnowsze dane dotyczące biologii neutrofilów oraz mechanizmów powstawania sieci NETs, stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej, zaplanowanej przez Doktorantkę. Na uwagę zasługuje część dotycząca dyskusyjnej roli zjawiska autofagii w procesie formowania sieci, w której Doktorantka stara się usystematyzować wiedzę na ten temat, posługując się własnym, opracowanym na podstawie danych z piśmiennictwa, schematem. Ciekawie przedstawionym zagadnieniem jest też fragment wstępu poświęcony powstawaniu reaktywnych form azotu (RFA) i ich współdziałaniu z reaktywnymi formami tlenu (RFT) w regulacji funkcji neutrofilów.

Jasno sformułowane założenia pracy, uzasadniają poszczególne cele badawcze, które mają wyjaśnić rolę i mechanizm indukcji formowania sieci NETs w wyniku działania RFA, z uwzględnieniem modyfikacji struktury histonów, zjawiska autofagii oraz zaangażowania w te procesy wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Zaplanowane badania, Doktorantka postanowiła przeprowadzić z wykorzystaniem pierwotnych komórek ludzkich, neutrofilów izolowanych z krwi chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD) oraz komórek linii HL-60, różnicowanych do komórek granulocytopodobnych, uzyskanych według własnego, opracowanego eksperymentalnie protokołu.

Opracowanie optymalnego protokołu różnicowania komórek HL-60 do komórek granulocytopodobnych, zdolnych do uwalniania sieci NETs, to temat pierwszej publikacji „*The influence of agents differentiating HL-60 cell toward granulocyte-like cell on their ability to release neutrophils extracellular traps*”, która ukazała się w *Immunology and Cell Biology*, o IF=3,947.

Biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia, wskazujące na zdolność zróżnicowanych komórek HL-60 do formowania sieci NETs w obecności uznanych stymulatorów, Doktorantka podjęła badania nad oceną uwalniania sieci przez komórki, które wcześniej poddała działaniu czynników różnicujących, m.in. takich jak: ATRA (kwas całkowicie *trans*-retinowy), DMSO (dimetylosulfotlenek) czy DMF (dimetyloformamid).

Uzyskane wyniki wykazały, że ATRA, spośród wybranych czynników, najbardziej efektywnie różnicował komórki HL-60 w kierunku komórek granulocytopodobnych, cechujących się brakiem cząsteczki CD14, obecnością CD15 oraz wyższą ekspresją CD11b, w porównaniu z komórkami indukowanymi przez pozostałe czynniki. Poza tym,

różnicowanie z ATRA prowadziło to powstania komórek o najwyższym stopniu dojrzałości, największych rozmiarach i krótszym czasie przeżycia w porównaniu z kontrolnymi komórkami HL-60.

Kolejnym etapem badań była ocena zdolności uzyskanych linii komórek granulocytopodobnych do uwalniania sieci NETs. Okazało się, że to komórki różnicowane w obecności DMF, a nie ATRA, najbardziej wydajnie uwalniały sieci NETs, zarówno po zastosowaniu PMA, jak i CI, które są potencjalnymi aktywatorami NETozy w neutrofilach krwi obwodowej. Ten model różnicowania prowadził do nabywania cech, najbardziej zbliżonych do neutrofilów krwi obwodowej w zakresie produkcji RFT, cytrulinacji histonu H3 oraz zjawiska autofagii.

Opracowany przez Doktorantkę protokół optymalnego różnicowania komórek HL-60 do linii granulocytopodobnej, o zdolności do uwalniania sieci NETs, został wykorzystany w badaniach nad rolą reaktywnych form azotu (RFA) w formowaniu NETs, które stanowią kluczową część rozprawy doktorskiej.

W pracy zatytułowanej „*Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophils extracellular traps*” opublikowanej w *Cellular and Molecular Life Sciences*, o IF=7.014, Doktorantka podjęła ważne i mało poznane zagadnienie udziału RFA w formowaniu sieci NETs.

Wybór tematu został podyktowany danymi, wskazującymi na potencjalną rolę tlenku azotu (NO), jako czynnika indukującego powstawanie sieci NETs, którego mechanizm nie został dotychczas wyjaśniony. Biorąc pod uwagę fakt, że poza NO, nie zbadano dotychczas roli ważnego metabolitu NO - nadtlenoazotynu, powstającego w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym, Doktorantka uwzględniła w swoich badaniach obie postaci RFA.

Na uwagę zasługuje fakt, że poza neutrofilami izolowanymi z krwi obwodowej, wykorzystana w swoich badaniach komórki uzyskane z krwi chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD), cechującą się brakiem aktywności oksydazy NADPH.

Doktorantka, po raz pierwszy wykazała, że nie tylko NO, ale także nadtlenoazotyn, ma zdolność do indukcji uwalniania sieci NETs i jest to zjawisko związane z aktywnością wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego PI3K. Szczególnie interesujące są dane wskazujące, że inhibitory enzymów produkujących RFT- MPO czy oksydazy NADPH, obniżają bądź blokują uwalnianie NETs po stymulacji z NO przez granulocyty chorych na CGD. Jakkolwiek, według przedstawionych wyników, aktywność oksydazy NADPH wpływa w większym stopniu na kinetykę, niż ostateczny wynik uwalniania sieci przez

neutrofile indukowane nadtlenuazotynem. Ponadto potwierdza, że to właśnie nadtlenuazotyn prowadzi do efektów, które były wcześniej przypisywane aktywności NO.

Badając mechanizm formowania sieci NETs przez NO czy nadtlenuazotyn, Doktorantka wykazała, że inhibitory PI3K, ale nie inhibitory degradacji autolizosomalnej, zapobiegały lub zmniejszały uwalnianie sieci, co sugeruje, że zjawisko to jest niezależne od autofagii.

Istotne jest także wykazanie, że zależne od NO i nadtlenuazotynu formowanie NETs nie jest także związane ze zjawiskiem cytrulinacji histonów i napływu wapnia. Natomiast okazało się, że stymulacja neutrofilów przez badane RFA prowadzi do translokacji elastazy neutrofilowej (NE) do jądra i degradacji histonów H2A i H2B. Powyższe obserwacje wskazują na działanie RFA podobne do PMA. Nie zostało to jednak potwierdzone w badaniach uwzględniających aktywację kinaz p38, ERK i AKT. Okazało się bowiem, że NO nie aktywuje powyższych kinaz, a jedynie nadtlenuazotyn selektywnie indukuje p38, co wskazuje, że różne stymulatory uwalniania sieci NETs mogą indukować różne drogi aktywacji.

Różnice w aktywacji kinazy p38 są zaskakujące w świetle faktu, że nadtlenuazotyn wydaje się pośredniczyć w większości efektów biologicznych NO. Dowodem na różne drogi aktywacji zależne od stymulatorów uwalniania NETs są eksperymenty przeprowadzone w warunkach deficytu oksydazy NADPH. Granulocyty chorych na CGD odpowiadają nie tylko na nadtlenuazotyn, ale też inne stymulatory powstawania sieci, niezależnie od aktywności oksydazy NADPH, i wówczas wykorzystują RFT pochodzenia mitochondrialnego czy patogennego. W wyniku zastosowania PMA, u chorych na CGD obserwowano nie tylko upośledzoną produkcję RFT, ale też i NO.

Na podkreślenie zasługują wyniki wskazujące, że RFA nie tylko same skutecznie indukują uwalnianie sieci NETs, ale także mogą nasilać właściwości innych fizjologicznych stymulatorów tego procesu, co skłania do dalszych badań w tym zakresie, zwłaszcza w stanach związanych z nadprodukcją zarówno RFA, jak i NETs.

Ponadto, Doktorantka zauważa, że opracowany przez nią eksperymentalny model komórek DMF-dHL-60, mimo iż najbardziej wydajnie uwalnia sieci NETs pod wpływem różnych stosowanych stymulatorów, nie spełnia tych warunków w przypadku RFA.

W podsumowaniu wyników obu prac, Doktorantka formułuje wnioski, wśród których najważniejsze wskazują na istotną rolę NO i jego metabolitu – nadtlenuazotynu w uwalnianiu sieci NETs przez ludzkie neutrofile.

Ważnym osiągnięciem jest wyjaśnienie mechanizmu powstawania NETs pod wpływem działania RFA, związanego z aktywnością kinazy PI3K, produkcją RFT i selektywną degradacją histonów H2A i H2B przez NE, bez zaangażowania zjawiska cytrulinacji histonów oraz autofagii. Na uwagę zasługuje też odkrycie wskazujące, że produkcja RFA zależy od rodzaju stymulatorów, które mogą aktywować różne szlaki sygnałowe, prowadzące do formowania sieci NETs.

Rozprawę mgr Anny Mandy-Handzlik na temat „**Rola reaktywnych form azotu w tworzeniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych**” oceniam bardzo wysoko, co potwierdza publikacja jej osiągnięć w wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

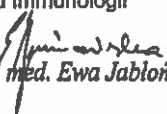
Podkreślić należy szeroką wiedzę Doktorantki w wybranej tematyce, umiejętność planowania i realizacji badań z wykorzystaniem wielu nowoczesnych technik, dzięki którym mogła uzyskać oryginalne i cenne wyniki, stanowiące istotny wkład do wiedzy na temat uwalniania sieci NETs w warunkach fizjologii i patologii.

Z pełnym przekonaniem oświadczam, że **rozprawa doktorska mgr Anny Mandy-Handzlik 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 późn. Zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r.. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.).**

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter przeprowadzonych przez Doktorantkę badań **wniosuję o wyróżnienie rozprawy**, która ma nie tylko charakter poznawczy, ale też może mieć istotne implikacje kliniczne, stanowiąc potencjalny cel terapii.

Z poważaniem

K I E R O W N I K  
Zakładu Immunologii

  
prof. dr hab. n. med. Ewa Jabłońska