

Akceptacja  


Kraków, 31 października 2022

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Anety Moskalik**

**p.t., „Fenotyp makrofagów serca myszy w zespole metabolicznym oraz oddziaływanie makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych in vitro”** wykonanej w Katedrze Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod promotorską opieką prof.dr hab. Anny Ratajskiej

Patomechanizmy niewydolności krążenia są złożone i ciągle nie do końca poznane, a ostatnio pojawiły się prace sugerujące udział zaburzeń układu limfatycznego w rozwoju niewydolności krążenia, zwłaszcza z zachowaną funkcją skurczową tzw. HFpEF.

Istotnie, w modelach zwierzęcych aktywacja limfogenezy przeciwdziała rozwojowi niewydolności mięśnia sercowego oraz przyspiesza rezolucję zapalenia w kardiomiopatii.

Regulacja czynności układu limfatycznego jest więc istotnym elementem patologii niewydolności serca i praca doktorska Pani mgr Anety Moskalik pt: „*Fenotyp makrofagów serca myszy w zespole metabolicznym oraz oddziaływanie makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych in vitro*” wykonana pod promotorską opieką Pani Profesor dr hab. Anny Ratajskiej w Zakładzie Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wpisuje się w to ważne zagadnienie. Punktem wyjścia do pracy doktorskiej były wyniki opisane w pracy Pani Niderla-Bielańskiej i współautorów (International Journal of Molecular Sciences w 2021, 22(4), 1-22), w której analizowano zmiany ekspresji wielu różnych mikroRNA w sercu myszy cukrzycowych (myszy db/db). W tej pracy wykazano, że ekspresja wielu różnych mikroRNA zmienia się w sercu myszy db/db i te zmiany dotyczą makrofagów. W szczególności w tej pracy wykazano, że poziom miR-31 był podwyższony, podczas gdy wszystkie inne badane mikro RNA w sercach myszy db/db i w makrofagach pochodzących z tego serca były obniżone.

Doktorantka postawiła hipotezę, że makrofagi z nadekspresją miR-31 przez mechanizmy zależne od miR-31 mogą regulować procesy związane z przebudową naczyń chłonnych oraz włóknienie u myszy db/db.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Anety Moskalik było więc zbadanie roli makrofagowego miR-31 w regulacji fenotypu komórek śródbłonka naczyń chłonnych, a żeby to osiągnąć doktorantka w pierwszej części pracy zbadała liczebność oraz fenotyp makrofagów serca myszy db/db, a potem w drugiej części pracy oceniła wpływ makrofagów transfekowanych miR-31 na komórki śródbłonka naczyń chłonnych in vitro. Dla porównania

doktorantka analizowała fenotyp komórek śródbłonka naczyń chłonnych transfekowanych miR-31.

Praca doktorska Pani mgr Anety Moskalik ma układ typowy monografii, zawiera też streszczenie w języku angielskim.

W obszernym wstępie opisane są podstawy patogenezy zespołu metabolicznego, przebudowy mięśnia sercowego, naczyń krwionośnych. Obszerny fragment wstępu dotyczy również fenotypu makrofagów w sercu i funkcje w kontekście niewydolności krążenia. Wartościowym elementem tej części wstępu jest tabela (tabela 2) podsumowująca różnice w różnych populacjach makrofagów serca i ich różne funkcje w kontekście nowej wiedzy o makrofagach. Jest to bardzo dobre podsumowanie obecnej wiedzy. Brakuje tylko bezpośrednich referencji do prac, które stanowią podstawę dla podanych informacji. Tego typu odniesienia zwiększyły by wartość tego typu tabeli, zakładając też, że informacje w niej zawarte wykraczają poza te przedstawione w cytowanej pracy [68].

W końcowej części wstępu znajduje się podsumowanie prac, które wskazują na rolę makrofagów w patologii sercowo-naczyniowej takich jak np. nadciśnienie czy niewydolność serca, oraz rolę makrofagów w regulacji limfogenezy z uwzględnieniem ważnej roli VEGF-C. W tej części recenzent odczuwał pewien niedostyt, zabrakło informacji o źródłach komórkowych VEGF-C, receptorach dla VEGF, przydałoby się też kilka słów na temat różnic działania VEGF-A, VEGF-B i VEGF-C, oraz krytycznego spojrzenia na rolę limfogenezy w patogenezie niewydolności serca, bo niektóre prace potwierdzają, a inne nie potwierdzają takiej roli limfogenezy. Być może doktorantka potrafiła by wyjaśnić i wytłumaczyć te niespójne wyniki w literaturze?

Ciekawe zestawienie doktorantka przedstawiła w tabeli 3, ale znów zabrakło szczegółów, np. mechanizmów przez które np. Angiopoetyna 2 (Ang2) stymuluje limfangiogenezę, a trombospodyna -1 (TSP-1) ją hamuje. W jednej kolumnie jest VEGF-C i uPA, IGF-1, IL-6, bez żadnej hierarchizacji te wiedzy. Nie znalazłem bezpośredniego odniesienia do prac pokazujących jakieś szczegóły tego działania, a ciekaw jestem ich znaczenia w fizjologii bądź patologii układu limfatycznego. Angiopoetyna 2 jest ważnym regulatorem czynności śródbłonka naczyń obwodowych, (np. przepuszczalności śródbłonka, integralności glikokaliksu) a TSP-1 uwalniana z płytek krwi ma szereg ważnych funkcji. Stąd te dwa czynniki regulujące limfangiogenezę zwróciły szczególną uwagę recenzenta, który chciałby się czegoś więcej na ten temat dowiedzieć.

Bardzo dobrze napisaną częścią pracy doktorskiej jest opis metod i ten rozdział świadczy o dobrym przygotowaniu doktorantki do badań i bardzo dobrej wiedzy w zakresie

stosowanych metod. Recenzent nie miał również uwag co do sposobu opisu wyników. Praca zawiera 19 rycin, 10 tabel. Są one opisane jasno i klarownie.

Recenzent zastanawia się jednak, dlaczego stosowano myszy db/db w wieku 21 tygodni, jest już to etap zaawansowanej patologii u myszy db/db. Może ciekawe by było prześledzić zmiany układu limfatycznego i fenotypu makrofagów od wczesnych etapów rozwoju hiperglikemii w tym modelu, która pojawia się dużo wcześniej. Już u 11 tygodniowych myszy obecna jest hiperglikemia, oporność na insulinę, podwyższone jest stężenie HbA1c, i obecne są wczesne zmiany śródbłonna świadczące o rozwoju dysfunkcji śródbłonna w aorcie, które nasilają się u 19 tygodniowych myszy z wyraźnie wtedy już upośledzoną produkcją śródbłonkowego NO (M.Targosz-Korecka i wsp. Scientific Reports 2017, 7: 15951). Można więc sadzić, że myszy 21 tygodniowe przedstawiają już zaawansowany fenotyp zmian w układzie sercowo-naczyniowym. Ciekawe by było opisanie w rozprawie doktorskiej zmian u 11 tygodniowych myszy db/db.

Przy okazji, recenzent chciałby zwrócić uwagę, że parametry charakteryzujące zespół metaboliczny u myszy db/db przedstawione w rozprawie są bardzo podstawowe, obejmują masę ciała, poziomy osoczowy trójglicerydów, glukozy bez żadnych innych parametrów. Z drugiej strony model myszy db/db jest dobrze znany, więc cel pracy doktorskiej w którym doktorantka napisała, że chciałaby scharakteryzować myszy db/db jako zwierzęcy model zespołu metabolicznego – nie jest ani uzasadniony, ani spełniony. W pracy jest przecież dość ubogi opis fenotypu myszy db/db. Jeżeli celem rozprawy było scharakteryzowanie makrofagów serca w tym modelu, warto by mieć szerszy pogląd na patologię ogólnoustrojową i patologię serca w badanym modelu tym bardziej, że zmiany makrofagów, ich fenotyp może ściśle zależeć od stanu funkcjonalnego serca i stanu wydolności układu mikrokrążenia wieńcowego i układu limfatycznego w tym modelu, które mogą się zmieniać w toku progresji tej patologii. Trudno więc odnieść poczynione obserwacje do funkcji serca i fenotypu metabolicznego na podstawie tak wyrywkowych danych dotyczących fenotypu patologii serca u 21 tygodniowych myszy db/db.

Bezspornie istotną wartością rozprawy doktorskiej jest scharakteryzowanie zmian w zawartości makrofagów, różnego typu u myszy db/db w stosunku do myszy kontrolnych. Należą się gratulacje doktorantce w wysortowaniu populacji tych makrofagów z serca mysiego i ich scharakteryzowanie. Jest to na pewno duże osiągnięcie. Bardzo ciekawą obserwacją pracy było stwierdzenie ponad czterokrotnego wzrostu ekspresji miR-31 w subpopulacji makrofagów Ly66C<sup>-low</sup> w stosunku do tej populacji makrofagów myszy kontrolnych przy mniejszej zawartości tych makrofagów, potwierdzonej w badaniach

immunocytochemicznych i braku zmian ekspresji miR-31 w innych populacjach makrofagów. Ten ciekawy wynik świadczy o specyficznej roli miR-31 w tej populacji makrofagów mysich. Ta obserwacja jest jedną z najciekawszych tej pracy doktorskiej.

Ponieważ makrofagi RAW 264.7 nie wykazują ekspresji miR-31 co potwierdzono w rozprawie doktorskiej (tab. 8c), doktorantka założyła, że transfekcja miR-31 do tych komórek mogłaby pokazać rolę miR-31 w regulacji naczyń chłonnych. Warto jednak wspomnieć, że komórki RAW 264.7 dalekie są fenotypem od makrofagów sercowych, więc jakiegokolwiek by były wyniki, to takie podejście ma swoje poważne ograniczenia. Pomimo tego, że uzyskano bardzo ciekawe wyniki wykazując, że transfekcja miR-31 wywoływała zmiany na poziomie mRNA i wydzielania niektórych białek, które mogą mieć udział w regulacji limfogenezy (spadek IGF-1, wzrost VEGF-C, TGF $\beta$ 1), supernatant z makrofagów RAW 264.7 transfekowanych miR-31 nie wpływał na funkcje i morfologie komórek śródbłonka naczyń chłonnych (LEC), choć zaobserwowane pewne zmiany w ekspresji mRNA (rycina 16). Czy istotnie na podstawie tych wyników można przypisać funkcjonalną rolę miR-31 w patologii układu limfatycznego i patologii serca u myszy db/db ?

Na marginesie, analizując te wyniki, można by pomyśleć że limfagiogeneza jest upośledzona u myszy db/db, bo jest zmniejszony poziom VEGF-C, i zwiększona ekspresja miR-31 powodowała wzrost VEGF-C jako mechanizm kompensacyjny, jednak supernatant z makrofagów transfekowanych miR-31 nie wywoływał zmian w czynności śródbłonka naczyń limfatycznych. Te obserwacje wymagają szerszej dyskusji i wyjaśnienia przez doktorantkę na obronę. Czy sam VEGF-C wywoływał zmiany funkcji i morfologie komórek śródbłonka naczyń chłonnych (LEC) ? Szkoda, że w tej pracy nie ma wyników obrazowania układu limfatycznego w sercu db/db, żeby mieć twardy punkt odniesienia do struktury mikrokrążenia limfatycznego u myszy db/db, oraz nie zastosowano innych metod oceny czynności śródbłonka naczyń limfatycznych w których VEGF-C by wywoływał oczekiwane zmiany.

Ważną część rozprawy doktorskiej jest ciekawa dyskusja zajmująca ok. 10 stron w której doktorantka dyskutuje cechy zespołu metabolomicznego u myszy db/db, fenotyp makrofagów u myszy db/db oraz efekt transfekcji miR-31 makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych in vitro.

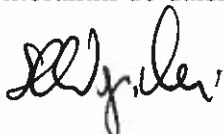
Doktorat kończy podsumowanie i cztery wnioski. Pierwszy z nich jest dość oczywisty i właściwie można by go nie umieszczać, bo nie stanowi żadnej nowości. Co do pozostałych trzech wniosków, to drugi wniosek jest bardzo dobry i ważny: fenotyp makrofagów serc myszy db/db jest zróżnicowany i najliczniejsza populacja wykazuje ekspresję markerów o profilu przeciwzapalnymi i ma wysoką miR-31, natomiast mniejsza liczebnie populacja

makrofagów ma fenotyp prozapalny. Trzeci wniosek jest zbyt ogólny i nie był przedmiotem pracy: mała liczebność makrofagów serc myszy db/db może wskazywać na występowanie zaburzeń odpowiedzi immunologicznej oraz brak możliwości efektywnego przeciwdziałania negatywnym skutkom zespołu metabolicznego w sercu. Czwarty, najważniejszy wniosek pracy doktorskiej, mówi, że makrofagi pod wpływem miR-31 mogą hamować limfagenezę oraz prowadzić do zmian strukturalnych i funkcjonalnych komórek śródbłonka naczyń chłonnych *in vitro* oraz hamować włóknienie. Zdaniem recenzenta nie ma w tej pracy przekonujących dowodów funkcjonalnych na takie stwierdzenie. Oczekiwałbym na obronie, dowodów na podtrzymanie tej tezy, oraz wskazanie przez doktorantkę jakiego typu doświadczenia powinny być przeprowadzone, żeby ta teza była dobrze udowodniona.

Pracę doktorską zamyka lista referencji obejmująca 198 pozycji oraz uchwała lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach. Ta ostatnia chyba nie musiała być dołączona, a może jest to reguła panująca w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym ?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr. Anety Moskalik p.t. *„Fenotyp makrofagów serca myszy w zespole metabolicznym oraz oddziaływanie makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych *in vitro*”* stanowi solidnie wykonaną, unikatową porcję badań dotyczących fenotypu makrofagów serca w mysim modelu zespołu metabolicznego, oraz wartościową i oryginalną próbę oceny roli miR-31 makrofagów w regulacji fenotypu komórek śródbłonka naczyń chłonnych. Uwagi krytyczne, które przedstawiłem w recenzji tej pracy, należy traktować jako zaproszenie do dyskusji. Recenzent, chciałby usłyszeć więcej argumentów przemawiających za wnioskami z tej pracy, dotyczącymi roli miR-31 makrofagów w regulacji limfagenezы, lub też usłyszeć alternatywne hipotezy, wskazujące na istotniejszy udział regulacyjny miR-31 makrofagów na inne aspekty fenotypu komórek śródbłonka naczyń krwionośnych (np. ekspresja emiliny-1, kolagenu I, N-kadheryny).

Pomimo uwag krytycznych o których mowa powyżej, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anety Moskalik, stanowi wartościowe dzieło, zawiera ciekawe i oryginalne wyniki badań i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności rozprawa doktorska spełnia warunki aktualnie obowiązującej Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wniosuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki