

Kraków, 31 października 2022

Akceptuję
A. Ratajskiej

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ lek. med Grzegorza Guli
p.t., „Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego” wykonanej w Katedrze Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod promotorską opieką prof.dr hab. Anny Ratajskiej

Makrofagi odgrywają istotną rolę w utrzymaniu hemostazy układu krążenia. W ostatnich latach odkrywano coraz nowe podtypy makrofagów i ich nowe funkcje. Jednak wiedza na temat makrofagów płodowych jest wciąż niepełna. Praca doktorska lekarza medycyny Grzegorza Guli pod tytułem „*Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego*” wykonana pod promotorską opieką pani profesor dr hab. Anny Ratajskiej z Katedry Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego miała na celu poszerzenie istniejącej wiedzy na ten temat i lepsze poznanie czynności makrofagów płodowych w mięśniu sercowym myszy.

Makrofagi w sercach płodowych myszy zbadano przy wykorzystaniu metod immunocytochemicznych w skrawkach mrożeniowych i preparatach całego serca, za pomocą cytometrii przepływowej oraz sortowania w końcu metodą RT-PCR, badając geny związane z procesami angiogenezy, limfangiogenezy oraz przebudowy macierzy pozakomórkowej. Serca płodowe badano w dwóch stadiach rozwoju, na etapie e14 i e17.

Przeprowadzone badania pracy doktorskiej pozwoliły na zidentyfikowanie i wysortowanie kilku subpopulacji makrofagów serca płodowego o różnych fenotypach, które charakteryzowały się różną ekspresją mRNA dla genów VEGF-C, VEGF-A, IGF-1, MMP-13 i badano też kilka innych genów.

W sumie przeprowadzone badania rozprawy doktorskiej wykazały, że w mysim sercu w okresie płodowym, istnieją wyraźnie różniące się między sobą subpopulacje makrofagów, których repertuar genów może świadczyć o ich odmiennej roli w regulacji angiogenezy, limfangiogenezy, oraz w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach morfogenezy serca.

Praca doktorska lek. med. Grzegorza Gula ma formę monografii i zawiera klasyczne rozdziały; wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja. Kończy pracę doktorską podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo. Streszczenie jest napisane w języku polskim oraz angielskim.

Warto podkreślić, że praca doktorska była zrealizowana częściowo w oparciu o środki projektu Diamentowy Grant, który uzyskał doktorat.

Wyniki będące przedmiotem mniejszej rozprawy doktorskiej były częściowo publikowane w pracy, w której doktorant jest pierwszym autorem, opublikowanej w czasopiśmie *Histochemistry and Cell Biology* (IF>3, Q1 w Histologii, Medical Laboratory Technology).

Na stronie 3 podane jest również praca przeglądowa, która podsumowuje wiedzę o makrofagach w morfogenezie serca i opublikowana jest w czasopiśmie *Developmental Biology* (IF>3, Q1 w *Developmental Biology*). Doktorant jest również jej pierwszym autorem.

Dla porządku, recenzent chciał się dowiedzieć, czy ta praca doktorska która ma formę monografii, opartej o wyniki opisane w rozprawie doktorskiej i przedstawione na 11 rycinach zawiera tylko te wyniki, które zostały już opublikowane w podanej pracy z *Histochemistry and Cell Biology*, czy zawiera również nie opublikowane wyniki ?

Przedstawiono do recenzji praca doktorska jest zwięzła i mieści się razem z podsumowaniem na niecałych 50 stronach. Ten fakt nie umniejsza jej wartości, bowiem praca uzupełnia wiedzę o fenotypie makrofagów w rozwoju mięśnia sercowego myszy. Bezsprzecznie osiągnięciem tej rozprawy doktorskiej jest wyodrębnienie 3 nowych subpopulacji makrofagów płodowych serca: CD64^{low}, CD64^{high}, CD206⁻ oraz CD64^{high} CD206⁺, i piękna dokumentacja morfologiczna i immunocytochemiczna. Wyodrębnienie tych subpopulacji było możliwe poprzez zastosowanie innych kombinacji przeciwciał dla markerów makrofagów, w stosunku do tych używanych we wcześniejszych pracach. Ciekawym znaleziskiem pracy, była też analiza ekspresji genów w wyodrębnionych makrofagach, która wskazywała, że te subpopulacje makrofagów mogą istotnie mieć odmienną rolę w angiogenezie, limfangiogenezie i w przebudowie macierzy pozakomórkowej.

Stwierdzono również, że odmienna jest morfologia i rozmieszczenie subpopulacje opisanych makrofagów w mięśniu sercowym. Recenzent, szczególnie zwrócił uwagę na to, że ekspansja makrofagów wydaje się postępować zgodnie z progresją powstawania naczyń wieńcowych i chłonnych w sercu. Choć nie stwierdzono różnic fenotypowych makrofagów przylegających do różnych typów naczyń krwionośnych, to stwierdzono występowanie antygenu Lyve-1⁺ w makrofagach w sąsiedztwie powstających kapilar mięśnia sercowego. Ten ciekawy wynik sugeruje, że interakcja makrofagów ze śródbłonkiem naczyniowym może mieć udział zarówno w toku angiogenezy jak i limfangiogenezy w rozwoju serca. W tym

kontekście, rodzi się oczywiście pytanie o udział analogicznej interakcji w angiogenezie dorosłego serca, oraz o udział makrofagów w mechanizmach naprawczych mikrokrążenia wieńcowego. Zabrakło szerszej dyskusji na ten temat.

Warto by też wskazać w dyskusji inne metody badań, które by mogły lepiej zdefiniować mechanizmy zależne od makrofagów w regulacji angiogenezy i limfangiogenezy i ich terapeutyczne znaczenie. Ciekaw jestem jak doktorant by tego typu badania zaplanował ? Recenzent również sugeruje, aby w czasie obrony pracy doktorskiej, doktorant podjął próbę wyjaśnienia dlaczego antygen Lyve-1 pojawia się w makrofagach i jakie czy ma to znaczenie fizjologiczne i patofizjologiczne, oraz w jakich innych komórkach występuje antygen Lyve-1.

W dyskusji dotyczącej podobieństwa makrofagów płodowych do makrofagów pochodzących z komórek iPSCs, doktorant wskazując na terapeutyczne możliwości ich zastosowania. Recenzent byłby ciekaw szerszej dyskusji tego zagadnienia i zdania doktoranta na ten temat różnych strategii postępowania terapeutycznego z wykorzystaniem makrofagów, o których mowa w bardzo krótkim akapicie dyskusji, włączając w te strategie, jak to nazwał doktorant, „odmładzanie tkanek”. Ten ostatni wątek, w przeciwieństwie do znanej dobrze i nie zawsze skutecznej, strategii podawania komórek aktywowanych do tkanki mięśnia sercowego, wydaje się recenzentowi szczególnie interesujący. Jest on ściśle związany w wynikami przedstawionej pracy, i zdolnościami angiogennymi oraz naprawczymi makrofagów płodowych, a został niestety bardzo pobieżnie przedyskutowany. Aż prosi się o szerszą informacja na temat. Jakie strategie doktorant miał na myśli ? Jakie są dla niej perspektywy i jej skuteczności.

W sumie dyskusja przedstawionej rozprawy doktorskiej, zawiera wiele ciekawych informacji. Są one jednak niejednokrotnie przedstawione bardzo skrótowo i wrywkowo. Dyskusja nie ma też żadnych podrozdziałów, co utrudnia jej lekturę. Przydałoby się również umieścić w dyskusji, dobre podsumowanie antygenów i subpopulacji zdefiniowanych makrofagów, ich lokalizacji, morfologii oraz postulowanych funkcji, być może w porównaniu do wiedzy na temat populacji makrofagów płodowego serca znaną z poprzednich prac. Tego typu rycina mogła by sumarycznie przedstawić najważniejsze znaleziska pracy doktorskiej, i podkreśliłaby co badania doktoranta wniosły nowego do wiedzy na temat makrofagów.

Podsumowanie zawiera 8 wniosków. Są one raczej podsumowaniem najważniejszych wyników, a nie wnioskami z tej pracy. Umiejętność syntetycznego przedstawiania nowości przedstawianej pracy i podkreślenie ważnych znalezisk, jest bardzo ważną cechą komunikacji naukowej i jest słabą stroną wniosków tej rozprawy doktorskiej. Dla przykładu w pkt. 6 podsumowania i wniosków jest mowa o tym, że zidentyfikowano dotychczas nie opisywany

podział makrofagów płodowych w oparciu o ekspresję markerów które w tej pracy zastosowano. Dlaczego to jest pkt. 6, a nie pkt. 1? Z kolei pkt. 1 mówi, że populacja makrofagów serca płodowego jest różnorodna i na podstawie markerów powierzchniowych można wyróżnić subpopulacje makrofagów serca. Bez trudu doświadczeń tej pracy doktorskiej można by takie stwierdzenie punktu 1, bez ryzyka napisać. Nie jest to więc specyficzne osiągnięcie tej pracy doktorskiej. Sadzę, że można by lepiej zdefiniować wnioski tej pracy dotyczące lokalizacji, fenotypu i funkcji rozróżnionych subpopulacji makrofagów serca płodowego. One powinny stanowić dopracowaną „wyjściową wizytówką” tej pracy, a tak nie jest.

Pomimo uwag krytycznych o których mowa powyżej, uważam, że rozprawa doktorska lekarza medycyny Grzegorza Guli p.t., „*Potencjalne funkcje populacji makrofagów serca płodowego*” dostarcza nową porcję wiedzy na temat makrofagów serca płodowego 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. Wnioskuje o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki