

OCENA

Rozprawy doktorskiej **mgr inż. Iwony Karwaciak** pt.: „**Działanie szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B w kontekście aktywacji receptora TLR2 w modelu różnicowania monocytu-makrofagi**”

W fazie różnicowania i wzrostu, komórki mieloidalne ulegają przekształceniu w dojrzałe komórki docelowe o charakterystycznej morfologii, z odpowiednią dla ich typu ekspresją genów, różnorodnych receptorów oraz cząstek sygnalizacyjnych, poczym zaczynają pełnić przypisane im funkcje biologiczne. Zapoczątkowanie zmian zachodzących w komórkach inicjowane jest przez egzo- i endogenne czynniki wzrostu i cytokiny. Sygnały pochodzące z receptorów po związaniu z odpowiednimi cytokinami regulatorowymi aktywują odpowiednie czynniki transkrypcyjne.

Główny cel pracy zawarty jest w tytule rozprawy. Zakres zadań badawczych zaplanowanych do wykonania przez **mgr Iwonę Karwaciak**, służących osiągnięciu celu pracy, uważam za w pełni przemyślany, uzasadniony i wymagający zarazem dużego nakładu pracy intelektualnej i laboratoryjnych umiejętności.

Recenzowana praca ma układ klasyczny z zastosowaniem właściwych proporcji poszczególnych części.

W obszernym **Wstępie**, na podstawie dostępnego piśmiennictwa, Doktorantka w uporządkowany sposób omówiła dane dotyczące pochodzenia i wielokierunkowej funkcji monocytów i makrofagów w organizmie, ich różnorodnej aktywności biologicznej uzależnionej od miejsca ich bytowania/przebywania i sygnałów odbieranych z zewnętrznego otoczenia. Przedstawiła także możliwości wpływu tych komórek na procesy zachodzące w organizmie w warunkach fizjologicznych i patologicznych, związane w znacznym stopniu z funkcjonowaniem układu odpornościowego, w tym mechanizmy oraz czynniki regulatorowe za pomocą których wpływają na te procesy. Wstęp zawiera również szczegółowe informacje o stanie wiedzy odnośnie zagadnień cząstkowych przewidzianych do oceny procesów zachodzących w komórkach.

Zakres pracy obejmował badania pozwalające uściślić sposoby aktywacji tych komórek i możliwość ewentualnej zmiany ich funkcji biologicznej, w przebiegu procesu różnicowania „monocytu-makrofagi” i pod wpływem aplikowanych sygnałów zewnętrznych np. ligandów bakteryjnych receptorów Toll-podobnych –TLR w warunkach *in vitro*.

Doktorantka oceniała:

- profil poziomu ekspresji białek z rodziny transkrypcyjnego czynnika jądrowego κ B (NF κ B), jego aktywacji przed i po ekspozycji komórek na czynnik różnicujący ‘monocytu-makrofagi’ oraz po aktywacji ligandem dla receptora TLR2

- wpływ procesu różnicowania i aktywacji ligandem receptora TLR2 na wybrane funkcje monocytów i makrofagów, takich jak zdolność do fagocytozy, produkcji cytokin, wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT)
- a także wpływ tych procesów na przeżywalność komórek oraz uszkodzenia białek w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego
- określenie enzymów i cząsteczek zaangażowanych w mechanizmy obrony antyoksydacyjnej komórek narażonych na stres oksydacyjny
- profil ekspresji i aktywność enzymów układu antyoksydacyjnego mogących mieć wpływ na odpowiedź komórek monocytarno-makrofagowych na stres oksydacyjny spowodowany ekspozycją komórek na bodziec różnicujący i aktywujący receptor TLR2.

W celu realizacji zaplanowanych zadań badawczych Doktorantka zastosowała dwie ludzkie monocytarne linie komórkowe THP-1 i Mono Mac 6 (MM6), o różnym stopniu dojrzałości komórek. Doktorantka wyczerpująco uzasadniła zalety wyboru modelu linii komórek ze wskazaniem niedogodności i ograniczeń wynikających z zastosowania komórek izolowanych *ex vivo*. Jakkolwiek, wyniki badań uzyskane przy użyciu modelowych monocytarnych linii komórkowych zweryfikowała z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu monocytów izolowanych z kożuszka leukocytarno-płytkowego zdrowych dawców. Wszystkie badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem odpowiednich, nowoczesnych technik badawczych, w tym metod biologii molekularnej. Opis metod jest odpowiedni i nie budzi zastrzeżeń.

W części **Wyniki** rezultaty badań zostały przedstawione w uporządkowany sposób, w 20 tabelach i w postaci 31 rycin według ustalonego schematu, kolejno, zgodnie z prawidłowo przeprowadzonymi doświadczeniami i szczegółowo omówione. Prześledzenie, zapamiętanie analizy licznych wyników uzyskanych z cząstkowych doświadczeń i ocenienie prawidłowości ich interpretacji oraz wyróżnienie tych najistotniejszych wymaga jednakże od czytelnika wzmożonej koncentracji.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że komórki linii THP-1 i MM6 przed i po różnicowaniu odmiennie reagują na bodźce zewnętrzne typu stres oksydacyjny lub aktywacja receptora TLR2. Proces różnicowania komórek linii THP-1 i MM6 *in vitro* ma istotny wpływ na ich odpowiedź funkcjonalną oraz reakcję na stres oksydacyjny w zależności od czynnika różnicującego i/lub indukującego stres. Różna oporność komórek obu linii na indukowany stres oksydacyjny związana jest z odmiennym poziomem ekspresji i aktywności składników enzymatycznego i nieenzymatycznego mechanizmu antyoksydacyjnego. Różni się ona również nie tylko od dojrzałości i typu linii komórek, ale także od aktywacji receptora TLR2 przez ligand bakteryjny. Monocyty izolowane z kożuszka leukocytarno-płytkowego i różnicowane w kierunku


makrofagów M1 i M2 w porównaniu z komórkami linii wykazują wyższą ekspresję składników systemu antyoksydacyjnego, składników czynnika NFκB oraz receptorów Toll podobnych.

Na szczególne wyróżnienie zasługuje **Dyskusja**, która jest bardzo logicznym i uporządkowanym podsumowaniem i interpretacją uzyskanych wyników w konfrontacji z danymi innych autorów. W tej części rozprawy Doktorantka w świetle wyników badań własnych zaznacza czytelnika z aktualnymi danymi i poglądami innych autorów na omawiany temat. **Wnioski** stanowią zwięzłe podsumowanie najistotniejszych wyników wraz z ich interpretacją. Doktorantka nie podała liczby wykorzystanego w rozprawie piśmiennictwa, ale miarą liczebności może być to, że mieści się ono na 34 stronach. Dobór piśmiennictwa świadczy o umiejętności selekcji danych. **Dyskusja** i **Wstęp** potwierdzają dobrą znajomość tematu i bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki. Rozprawa zawiera **Streszczenie** w języku polskim i angielskim i kończy się Wykazem skrótów.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa napisana jest bardzo starannie, jasnym i dobrze zrozumiałym stylem, część dokumentacyjna została przedstawiona logicznie choć nie zawsze przejrzysto. Niedosyt budzi sposób opisu analizy statystycznej wyników pod tabelami i rycinami, brak ujednoczenia skali na niektórych rycinach, być może przeliczenie na inną jednostkę miary byłoby bardziej czytelne, choć rozumiem, że nie zawsze jest to możliwe lub skuteczne. Brak jest informacji jaka analiza statystyczna została zastosowana, zakłopotanie budzi też sposób podania liczby n oraz czy jest ona dostateczna/wystarczająca do zastosowanych testów. Doktorantka stosuje n równe (=) lub n równe lub większe (\geq) lub np. $n = 2+8$. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na anglicyzmy w rodzaju: eksprymować, bazalny poziom, lokalizacja, system NFκB, worteksować, komórki epitelialne i endotelialne lub niefortunne językowe: na spektrofotometrze, na czytniku, „komórki makrofagów lub na komórkach monocytów”. Wspomniane uwagi nie mają oczywiście wpływu na wysoką ocenę wartości merytorycznej przedstawionej rozprawy, a stanowią jedynie dopełnienie recenzji, która z definicji pełni „funkcję informacyjną, wartościującą i postulatywną”.

Uważam, że recenzowana praca stanowi samodzielne rozwiązanie projektu badawczego przez autora i w pełni spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach oraz tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr65, poz.595 z późn. zm.). Z pełnym przekonaniem wnoszę zatem wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie **mgr inż. Iwony Karwaciak** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, dnia 01. 12. 2015 r.


Dr hab. Zofia Sułowska, prof. IBM PAN