

Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 12 lutego 2021r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Kobuszewskiej zatytułowanej „Mikrosystemy przepływowe typu Lab-on-a-Chip do badania niedotlenienia komórek mięśnia sercowego”, wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierownictwem promotora dr hab. inż. Elżbiety Jastrzębskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy zagadnienie ważnego nie tylko z poznawczego ale także klinicznego punktu widzenia, ponieważ takie badania przyczyniają się do rozwoju medycyny regeneracyjnej. Cel pracy uważam za właściwy i wart zrealizowania tym bardziej, że Doktorantka koncentruje się na badaniach dotyczących potencjalnego leczenia zmian w mięśniu sercowym powstałych na skutek skutków chorób dotyczących tego narządu. W sytuacji gdy zaburzenia sercowo-naczyniowe są pierwszą przyczyną zgonów w krajach wysokorozwiniętych podejmowanie takich badań jest wysoce pożądane.

Rozprawa jest starannie przygotowana i zgodnie z ogólnymi zasadami jest podzielona na kilka głównych rozdziałów zatytułowanych jak następuje: Wykaz skrótów, Przegląd Literaturowy, Praca badawcza wraz z opisanymi metodami, Podsumowanie i wnioski, Literatura, Podziękowania i Dorobek Naukowy.

Rozprawa zawiera dwa istotne i przenikające się aspekty. Pierwszy z nich to aspekt „chemiczno-inżynierski” dotyczący optymalizacji mikroskalowej hodowli komórek w systemie 3D, a zatem stworzenia warunków możliwie blisko oddających sytuację *in vivo*. Doktorantka dokładnie opisuje technologię otrzymywania stosownych podłoży z wykorzystaniem odpowiednich polimerów oraz opisuje warunki fizyczne jakie muszą być uzyskane by zapewnić łatwość wymiany gazowej oraz szybkość dyfuzji oraz przedstawia przebieg doświadczeń z wykorzystaniem stworzonych układów. Uważam, że zagadnienia te są opisane w sposób bardzo szczegółowy, co świadczy o kompetencji doktorantki, natomiast nie jestem ekspertem w dziedzinie inżynierii chemicznej i chemii polimerów, stąd jestem powściągliwy w ocenie merytorycznej tego wątku pracy. Dlatego w dalszej części recenzji skupiam się na biologicznym aspekcie rozprawy.

Uwagi dotyczące biochemicznych aspektów rozprawy

Doświadczenia biochemiczne zostały wykonane z wykorzystaniem komórek serca w hodowlach *in vitro* prowadzonych w omawianych systemach 3D i porównywanych do hodowli 2D stanowiących punkt odniesienia. Ponadto, Doktorantka wprowadziła do swoich badań hodowle niejednorodne zawierające komórki serca oraz mezenchymalne komórki macierzyste. Celem tych doświadczeń było porównanie odpowiedzi komórek rosnących w

różnych systemach hodowlanych na stres spowodowany niedotlenieniem. Takie badania mają niewątpliwą wartość szczególnie w kontekście niedotlenienia mięśnia sercowego, co ma miejsce np. w przypadkach utonięć lub zadławienia.

Jednak Doktorantce nie udało się uniknąć błędów, które mocno zaważyły na interpretacji uzyskanych wyników. Odnoszę wrażenie, że wynikały one z **błędneho rozumienia mechanizmu działania związków rozprzegających oksydacyjną fosforylację**, w tym stosowanego w opisywanych badaniach FCCP. Dobitnie tego dowodzi zdanie jakie znajduje się na stronie 41 dysertacji. Brzmi ono następująco: Mechanizm działania tych związków (*FCCP, dopisek recenzenta*) opiera się na przerwaniu łańcucha elektronowego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Efektem jest zaburzenie... itd”. To zdanie jest nieprawdziwe. Pominąwszy fakt, że termin ”łańcuch elektronowy” jest niezrozumiały (chodzi o łańcuch transportu elektronów, czyli kolejne systemy oksydoredukcyjne znajdujące się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej), to w obecności substancji rozprzegających łańcuch oddechowy „pracuje” z maksymalną szybkością transportując elektrony na tlen i doprowadzając do czteroelektronowej redukcji cząsteczki O₂ i wytworzenia wody. Nie ma zatem mowy o warunkach beztlenowych, w których poszczególne elementy łańcucha są zredukowane, a stosunek stężeń NADH do NAD⁺ jest bardzo wysoki. W obecności FCCP sytuacja jest całkowicie odwrotna. FCCP znosząc potencjał błonowy nie tylko **nie zmniejsza** zużycia tlenu lecz przeciwnie powoduje **spotęgowanie tego procesu czasem wielokrotne, aż do szybkości maksymalnej**. To wynika wprost z istoty działania substancji rozprzegających oksydacyjną fosforylację. Pojawiające się w pracy stwierdzenie że FCCP to „czynnik niedotleniający” prawdopodobnie powstało na podstawie pozycji literaturowej nr 121. „*A myocardial hypoxia environment was created using an oxygen consumption blocking reagent, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*”. Prawdą jest, że podanie FCCP w zbyt dużym stężeniu powoduje **niekontrolowane skutki uboczne** i spowolnienie (ale czy całkowite zahamowanie?) oddychania. Mechanizm tego niepożądanego działania jest niejasny i należy to traktować jako niezdefiniowany efekt toksyczny. W dobrze zaplanowanych doświadczeniach nie dochodzi do takiej sytuacji. 30 μM FCCP jaki stosowano w cytowanej pracy jest co najmniej o rząd wielkości zbyt stężony. Już w obecności ok. 100 nM FCCP w większości komórek dochodzi do spadku potencjału błony mitochondrialnej nie z powodu hipoksji tylko na skutek działania protonoforowego dodanej substancji. To niewłaściwe rozumienie działania substancji rozprzegającej znalazło też odzwierciedlenie w tytule pracy ponieważ w żadnym momencie rozprawy nie ma mowy o niedotlenieniu.

A zatem, w obecności FCCP nie tworzy się potencjał protonowy, bo protonofor z definicji to uniemożliwia, a zatem nie dochodzi do fosforylacji ADP z wytworzeniem ATP, a energia jest rozpraszana w postaci ciepła. Jak już wcześniej wspomniałem, w obecności FCCP dochodzi do obniżenia stosunku stężeń substratów zredukowanych do utlenionych (i ostatecznie NADH/NAD⁺) podczas gdy w warunkach rzeczywistego niedotlenienia stopień zredukowania bardzo zwiększa się. Taki efekt można by uzyskać stosując zamiast FCCP inhibitory transportu elektronów np. rotenon i antimycynę. W ich obecności podobieństwo skutków zarówno ostrych jak i odległych do tych wywołanych niedotlenieniem jest znacznie większe, a wynik testu z Almar blue byłby zapewne przeciwny.

Skoro jednak Doktorantka zdecydowała się na rozprzęgnięcie oksydacyjnej fosforylacji jako sposobu na uzyskanie efektu zbliżonego do niedotlenienia to nie jest dla mnie jasne jaki był cel stosowania FCCP w tak dużych stężeniach. FCCP jest bardzo silnym czynnikiem rozprzęgającym, a dobór jego stężenia powinien być przeprowadzony dla każdej linii komórkowej, tak by stosować tę substancję w stężeniu jak najmniejszym ale maksymalnie stymulującym oddychanie. Skoro w przypadku hodowli w makroskali efekty wyrażone spadkiem potencjału były takie same dla każdego ze stosowanych stężeń (począwszy od 10 μM jako najmniejszego testowanego) to należało przetestować 1 i 0,1 μM FCCP zamiast 70 μM . Tak się postępuje, by zminimalizować ryzyko powstawania artefaktów na skutek nieprzewidywalnego działania substancji w niepotrzebnie wysokim stężeniu. Doktorantka oceniała stopień energizacji mitochondriów przy pomocy sondy JC-1 i w zasadzie nie jest jasne jakiego innego efektu mogła się spodziewać poza szybkim i całkowitym zniesieniem potencjału. I nie było to ani skutkiem apoptozy ani dowodem na jej rozwój, a jedynie następstwem uprzepuszczalnienia wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów. A brak potencjału oznacza znaczny spadek wytwarzania ATP w komórkach (pozostaje glikoliza). Co więcej, przy braku potencjału mitochondrialna ATPaza katalizuje hydrolizę ATP powstałego w czasie glikolizy. Nie jest to miarą żywotności komórek czy też apoptozy, ale prostą konsekwencją zniesienia potencjału błony mitochondrialnej. To samo dotyczy wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytosolu. Brak potencjału, w efekcie brak ATP a zatem brak energii do usuwania Ca^{2+} z komórek wbrew gradientowi stężenia. Nawiasem mówiąc, w celu wykrywania jonów wapnia stosowano sondę Fluo-4 (tak jest w rozprawie). Mam nadzieję, że w istocie komórkom podawano Fluo-4 AM, czyli ester, który przenika przez błonę plazmatyczną i we wnętrzu komórek ulega hydrolizie.

Doktorantka nie wykonała ani jednego testu na apoptozę, więc interpretacja wyników w oparciu o ten proces była całkowicie nieuzasadniona. Owszem, FCCP bywa niekiedy wykorzystywane w celu wywołania apoptozy (i to w stężeniu wyższym niż konieczne do rozprzęgnięcia oksydacyjnej fosforylacji), ale to wymaga znacznie dłuższej np. 24-godzinnej inkubacji komórek. Wtedy dysfunkcja mitochondriów inicjuje apoptozę ale spadek potencjału jest tu bodźcem, a nie skutkiem i dowodem na apoptozę. Spadek potencjału błony mitochondrialnej pojawia się w przebiegu apoptozy wywołanej wieloma innymi czynnikami np. H_2O_2 ale w przypadku substancji rozprzęgającej spadek potencjału jest natychmiastowy poprzedzając inne efekty, bo taki jest mechanizm działania protonoforów. I w tym celu są te substancje stosowane. Co więcej, w badaniach nad apoptozą FCCP stosuje się zazwyczaj jako pozytywną kontrolę w celu pokazania jak w konkretnych komórkach i przy konkretnym protokole doświadczalnym „świecą” komórki z całkowicie zdeenergizowanymi mitochondriami (bez potencjału błonowego) dla porównania ze skutkami działania innych, testowanych substancji. W przypadku doświadczeń, w których stosowano komórki mezenchymalne, brakuje mi odpowiednich doświadczeń kontrolnych lub informacji jak odróżniano zmiany w kardiomiocytach od tego, co zostało wprowadzone wraz z komórkami macierzystymi.

Interpretacja uzyskanych wyników w kontekście chorób sercowo-naczyniowych wymaga wyjaśnienia, że zatrzymanie przepływu krwi w naczyniach wieńcowych jest związane nie tylko z brakiem tlenu ale także brakiem glukozy, co ogranicza glikolityczne wytwarzanie ATP. Ponadto, przyczyną uszkodzeń kardiomiocytów w następstwie udaru i przywrócenia ukrwienia (ischemia/reperfuzja) nie jest niedotlenienie jako takie ale następujące po nim przywrócenie krążenia. W takich warunkach dochodzi do wzmożonego wytwarzania reaktywnych form tlenu, co w efekcie inicjuje apoptozę. W obecności prawidłowo stosowanego FCCP powstawanie ROS jest bardzo ograniczone. Dlatego substancje rozprzegające mogą raczej łagodzić skutki ischemii i reperfuzji niż wywoływać zbliżone skutki. W recenzowanej pracy brakuje mi głębszej analizy obserwowanych zjawisk, a przede wszystkim precyzyjnego z biologicznego punktu widzenia przedstawienia założeń pracy uzasadniających przyjęty protokół doświadczalny.

Podsumowując, tematyka przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i ważna. Jednakże, jako biochemik nie mogę zaakceptować błędów dotyczących założeń pracy, części doświadczalnej, a przede wszystkim poważnej nadinterpretacji uzyskanych wyników. **Uważam, że doktorantka w swoich badaniach wykazała jedynie, że hodowane w testowanych układach komórki żyją i są wrażliwe na czynnik rozprzegający. Dla udowodnienia przydatności modelu hodowli 3D być może jest to wynik wystarczający** (i dysponując przedstawionymi danymi na tym bym poprzestał) **i w tym sensie cel pracy doktorskiej został osiągnięty.** Natomiast uzyskane wyniki z pewnością nie pozwalają na głębszą interpretację dotyczącą biologicznych aspektów pracy, do której Doktorantka posunęła się popełniając przy tym istotne błędy. Każdy z przedstawionych na rysunkach wyników był oczekiwany i łatwo wytłumaczalny w oparciu o proste działanie rozprzegające protonofora. Niestety przedstawiona mi do recenzji praca zawiera wiele nieprawdziwych informacji i wniosków, przez co w tej postaci nie spełnia oczekiwań stawianym rozprawom doktorskim i wymaga istotnego poprawienia przed przedstawieniem jej do ponownej recenzji. Jest to ważne także z tego względu, że rozprawy doktorskie są dostępne dla szerokiego grona osób, w tym studentów i doktorantów, więc powinny być wolne od rażących błędów. Natomiast doceniam wartość poznawczą podjętych badań i dlatego uważam, że odpowiednia korekta rozprawy sprawi, uzyska ona pozytywną ocenę.

Poniżej znajduje się lista **przykładowych** mniej istotnych błędów i potknięć wnikających zarówno z nieuwagi jak i braku precyzji.

Spis skrótów: PCR to reakcja łańcuchowa polimerazy a nie „łańcuchowej polimerazy”.

str.17. „Miejsce martwicy tkanki sercowej”. Nie ma czegoś takiego jak „tkanka sercowa” a niedotlenienie dotyczy narządu i kardiomiocytów.

str. 19. „Ścinanie cieczy” Coś nie brzmi

str. 20. 5-Azacytydyna a nie : „5-azacydyna”

str. 29. EA-hy926 to hybrydowe komórki śródbłonna, a nie nabłonka

str. 33. „regulacja mikrośrodowiska” co to oznacza?

str. 34 Rys. „Szkłane szkiełko”.

str. 38. „Bicie komórek” Może raczej kurczenie się?

str. 41. „synteza cząsteczek ATP” chyba lepiej synteza ATP a najlepiej fosforylacja ADP

str. 44. Wydzielanie „się” czynnika wzrostu. Raczej bez „się”

str. 44. MitoTracker Red nie jest markerem wczesnej apoptozy, a FCCP nie jest czynnikiem niedotleniającym

str. 53. Nie jest jasne dlaczego „oddziaływanie FCCP z błoną komórkową (*rozumiem, że chodzi o plazmatyczną*) ma powodować zwiększoną przepuszczalność dla protonów **i w związku z tym** wpływać na łańcuch oddechowy.

str. 56 Test z Almar blue pozwala ocenić stopień zredukowania metabolitów (wartość NADH/NAD⁺ ostatecznie) ale nie aktywność metaboliczną komórek.

