

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. "Analiza zmian biochemicznych towarzyszących mikrocytozie krwinek czerwonych, w tym talasemii alfa, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji stanu redoks białek erytrocytarnych" mgr Katarzyny Kozy

Niedokrwistości mikrocytowe mają różną etiopatogenezę. Najczęściej występującą na świecie niedokrwistością mikrocytową jest nabyta niedokrwistość z niedoboru żelaza. Inne niedokrwistości mikrocytowe to niedokrwistości wrodzone spowodowane mutacjami genów, które prowadzą do zaburzeń syntezy globiny. Są to talasemie i hemoglobinopatie. Inne rzadkie przyczyny anemii mikrocytowych to nieprawidłowości genetyczne prowadzące do zaburzeń metabolizmu żelaza lub hemu. Diagnostyka laboratoryjna w/w anemii jest ustalona, ale istnieją nadal pewne problemy w różnicowaniu mikrocytoz.

Znacznie mniej wiadomo o wpływie stresu oksydacyjnego na białka błonowe krwinek czerwonych w talasemii alfa, niedokrwistościach mikrocytowych wrodzonych i niedokrwistości nabytej z niedoboru żelaza. Mało również jest wiadomo na temat mechanizmów antyoksydacyjnych, które chronią erytrocyty w tych niedokrwistościach.

Doktorantka postanowiła zbadać w erytrocytach chorych na niedokrwistość z niedoboru żelaza, talasemii alfa i innych niedokrwistościach wrodzonych:

- 1> Poziom endogennego stresu oksydacyjnego i pojemności antyoksydacyjnej wiązania przeciwciał przez wybrane białka powierzchniowe, między innymi istotne dla ochrony przed hemolizą.
- 2> Poziom białka peroksyredoksyny 2 jako elementu obrony antyoksydacyjnej
- 3> Stopnia wiązania przeciwciał przez wybrane białka powierzchniowe, między innymi istotne dla ochrony przed hemolizą.

Badaniem objęto 25 chorych na talasemię alfa, 50 z mikrocytozą inną niż talasemie, 10 z nabytą niedokrwistością z niedoboru żelaza. Grupę kontrolną stanowiło 90 zdrowych dawców krwi. Diagnozę ustalano na podstawie wykładników morfologicznych krwi obwodowej, badania gospodarki żelazowej, stężenia bilirubiny i aktywności LDH. Rozpoznanie ustalali lekarze specjaliści, leczący w/w chorych. Po wykluczeniu nabytej niedokrwistości z niedoboru żelaza wykonywano badania genetyczne. Badanie stresu oksydacyjnego

wykonywano metodą cytometrii przepływowej oznaczając reaktywne formy tlenu(RFT). Zastosowano w tym celu diocetan dichlorodihydrofluorosceiny(DCFH-DA), który po wnikięciu do komórki osiąga fluorescencyjną postać dichlorofluorosceiny(DCF). Natężenie fluorescencji mierzonej metodą cytometrii przepływowej odzwierciedla poziom RFT w komórkach. Indukcję stresu oksydacyjnego i badanie pojemności antyoksydacyjnej erytrocytów badano metodą cytometrii przepływowej. Stopień wiązania przeciwciał do wybranych białek powierzchniowych krwinek czerwonych badano metodą cytometrii przepływowej. Były to białka: CD44, CD47, CD55, CD58, CD59, CD235a. We frakcji cytozolowej krwinek czerwonych, oznaczano peroksyredoksynę 2 i białka mutazy bifosfoglicerynianowej metodą półilościową Western blot.

Autorka użyła do analizy wyników odpowiednich metod statystycznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Katarzyna Koza stwierdziła, że reaktywne formy tlenu(RFT) wskazujące na nasilenie stresu oksydacyjnego były porównywalne w erytrocytach chorych na trzy badane rodzaje niedokrwistości i w grupie kontrolnej. Indukcja stresu oksydacyjnego *in vitro* z użyciem czynnika utleniającego(H_2O_2) wykazała brak istotnych zmian RFT w erytrocytach chorych we wrodzonej mikrocytozie innej niż talasemie, wzrost stresu oksydacyjnego w anemii z niedoboru żelaza i istotnie zmniejszenie poziomu RFT w krwinkach chorych na talasemię alfa. Autorka stwierdziła istotny wzrost stężenia peroksyredoksyny 2 u chorych na talasemię alfa. Interesujące są wyniki badania wiązania wybranych cząsteczek powierzchniowych przez przeciwciała. Dotyczy to antygenów powierzchniowych zaangażowanych w różnicowanie się erytrocytów. Część z tych białek chroni komórki przed hemolizą. Dotychczas nie opisywano wyników badań dotyczących zmian w nasileniu wiązania swoistych przeciwciał przez cząsteczki CD krwinek czerwonych w talasemii alfa. Są to indywidualne spostrzeżenia mgr Katarzyny Kozy. Badanie stopnia wiązania przeciwciał przez wybrane białka sugeruje wg doktorantki możliwość rearanżacji błony komórkowej krwinek czerwonych we wszystkich badanych niedokrwistościach. Wyniki pracy doktorantka przedstawiła na 11 rycinach i 5 tabelach. Praca liczy 124 strony. Układ pracy jest typowy dla tego rodzaju rozprawy. Literatura liczy 275 pozycji polskiego i anglojęzycznego piśmiennictwa, z uwzględnieniem najnowszych pozycji. W obszernym wstępie doktorantka omawia proces erytropoezy, budowę krwinek czerwonych, budowę i funkcje hemoglobiny, przyczyny mikrocytozy, oraz omawia rolę stresu

oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej w krwinkach czerwonych. Mgr Katarzyna Koza doskonale opanowała warsztat badawczy.

Mgr Katarzyna Koza uzyskała odpowiedzi na postawione pytania, osiągnęła cele pracy.

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników przedstawiła następujące wnioski:

1. Endogenny poziom stresu oksydacyjnego, wyrażony jako stężenie reaktywnych form tlenu w komórce, był porównywalny w krwinkach czerwonych prawidłowych i mikrocytowych, niezależnie od etiologii defektu.
2. Indukcja stresu oksydacyjnego *in vitro* powodowała wzmożenie obrony antyoksydacyjnej w krwinkach czerwonych w talasemii alfa
3. Elementem wzmożonej obrony antyoksydacyjnej w erytrocytach w talasemii alfa może być zwiększony poziom peroksyredoksyny 2 we frakcji cytozolowej
4. Zmiany w nasileniu reakcji przeciwciał z wybranymi antygenami CD wskazują na możliwe rearanżacje frakcji białek błonowych w badanych mikrocytozach, niezależnie od ich etiologii
5. Ocena potencjału antyoksydacyjnego i stężenia peroksyredoksyny 2 we frakcji cytozolowej krwinek czerwonych mogą być pomocne w różnicowaniu talasemii alfa i innych mikrocytoz.

Uwag merytorycznych nie mam. Oceniam wysoko pracę doktorską mgr Katarzyny Kozy. Na podkreślenie zasługuje określenie stężenia peroksyredoksyny 2 w erytrocytach badanych przez doktorantkę chorych z mikrocyzami. U chorych na talasemię alfa stężenie tego białka było istotnie wyższe w porównaniu z badanymi grupami. Jest to oryginalne spostrzeżenie autorki, która sugeruje, że może to odzwierciedlać udział peroksyredoksyny 2 we wzmożonej odpowiedzi antyoksydacyjnej.

Wnoszę do Wysokiej Rady Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie mgr Katarzyny Kozy do dalszych etapów przewodu doktorskiego na podstawie paragrafu 6 ust. 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r w sprawie szczegółowego przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Wnoszę do Wysokiej Rady Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o wyróżnienie pracy mgr Katarzyny Kozy. Doktorantka zbadała mało znane procesy stresu oksydacyjnego i pojemności antyoksydacyjnej erytrocytów w badanych mikrocytozach, z uwzględnieniem talasemii alfa. Stwierdziła wzrost stężenia peroksyredoksyny 2 w cytosolu erytrocytów chorych na talasemię alfa co jest jej oryginalnym spostrzeżeniem i może mieć znaczenie praktyczne w różnicowaniu tej choroby z innymi mikrocytozami. Wyniki badania nasilenia wiązania cząsteczek CD obecnych na powierzchni erytrocytów z wybranymi przeciwciałami u chorych na talasemię alfa są własnym spostrzeżeniem mgr Katarzyny Kozy i stanowią przyczynek do pogłębienia wiedzy o tej chorobie i być może pozwoli przewidywać nasilenie procesu hemolizy, co miałoby istotne znaczenie dla klinicysty.

Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek

Prof. dr hab. n. med.

Warszawa. 15. 08 2018