

dr hab. inż. Magdalena Przybyło, prof. PWr
Politechnika Wrocławska
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Zuzanny Sas
zatytułowanej „Identyfikacja i zbadanie nowego mechanizmu wychwytu
wolnej hemoglobiny w wątrobie u myszy”

Informacje ogólne

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska pani mgr Zuzanny Sas pt. „Identyfikacja i zbadanie nowego mechanizmu wychwytu wolnej hemoglobiny w wątrobie u myszy” wykonanej pod kierunkiem promotora pana dr hab. Tomasza Rygla, w Zakładzie Immunologii Wydziału Lekarskiego, Warszawskiego Uniwersytetu w Warszawie.

Podstawa prawna recenzji opiera się na określeniu czy spełnia ona wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. Zm.).

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska pani mgr Zuzanny Sas obejmuje badania nad mechanizmem wychwytu wolnej hemoglobiny w modelu mysim, odmiennego od mechanizmu jej usuwania przez makrofagi obecne w wątrobie oraz śledzienie. Dotyczy ona ważnego, i nie do końca poznanego, elementu homeostazy żelaza związanego z wchłanianiem z układu krążenia wolnej hemoglobiny. Homeostaza żelaza jest krytyczna z punktu widzenia fizjologii oraz metabolizmu komórkowego. Wszelkie zakłócenia homeostazy żelaza są często związane ze schorzeniami wynikającymi nie tylko z jego niedoboru czy z nadmiaru, ale także z niewłaściwej dystrybucji. Samo żelazo jest elementem wielu kluczowych procesów metabolicznych, np. dystrybucji tlenu w organizmie czy homeostazy energetycznej komórek. Praca doktorska przedstawia wyniki jednoznacznie wskazujące na wychwyt przez sinusoidalne komórki śródbłonna wątroby LSEC, przedstawiając alternatywny mechanizm usuwania hemoglobiny, z wyjaśnieniem molekularnym samego procesu. Uzyskane wyniki badań stanowią nowe i ważne odkrycie w dziedzinie fizjologii wątroby i mogą mieć duże znaczenie dla badań nad niedokrwistością oraz w badaniach aplikacyjnych w dziedzinie farmakologii.

Założenia oraz cel pracy, zaprezentowane ogólnie w Streszczeniu pracy, a następnie uszczegółowione w rozdziale 2, sformułowane zostały jednoznacznie i precyzyjnie. Wyniki badań naukowych prowadzonych w tak określonym celu stanowią element nowy i oryginalny, przede wszystkim w dziedzinie fizjologii wątroby oraz układu krwionośnego. Zakres tematyczny zaprezentowanych w rozdziale 1 informacji wstępnych został dobrany właściwie, na bazie obszernego piśmiennictwa w tematyce pracy. To świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę umiejętności wyszukiwania, selekcjonowania i syntezy informacji

zawartych w źródłach naukowych. Przedstawione opisy są zwięzłe i rzeczowe, jednocześnie wyczerpujące. Rozdział 2 przedstawia wspomniane wcześniej założenia i cele pracy. Rozdział 3 rozpoczyna część dysertacji, w której Doktorantka prezentuje metodykę i wyniki własnych prac doświadczalnych. W rozdziale 3 przedstawiono model zwierzęcy wykorzystany do badań, metody ekstrakcji badanych molekuł, izolacji komórek, metody znakowania sondami fluorescencyjnymi badanych białek oraz izotopami, metody kompleksowania hemoglobiny, analizy ekspresji genów, protokoły związane z badaniami na hodowlach komórkowych, jak również wykorzystane techniki obrazowania in-vivo oraz in-vitro. Opisy zaprezentowane w rozdziale pokazują iż Doktorantka posiada niezwykle szerokie kompetencje w technikach laboratoryjnych co zasługuje w pełni na uznanie. Dla oceny indywidualnych osiągnięć naukowych Doktorantki najważniejszy jest rozdział 4 rozprawy, w którym zostały przedstawione wyniki własne. Przedstawione wyniki badań, w tym doświadczenia kontrolne z indukowaną przez liposomowy kłodronat deplecją makrofagów, jednoznacznie wykazały zdolność wychwytu Hb przez wątrobę jako organ, wskazując na alternatywną drogę wychwytu przez komórki LSEC. Przeprowadzone badania w bardzo rzetelny sposób dokumentują również mechanizmy komórkowe odpowiadające za wychwyt wolnej hemoglobiny. Przedstawione w pracy wyniki badań poparte kompleksową analizą statystyczną potwierdzają jednoznacznie tezy zaproponowane w rozprawie doktorskiej, trafnie przedstawione we wnioskach i mające uzasadnienie w przeprowadzonej dyskusji. W kontekście zaprezentowanych wyników badań, poniżej przedstawiam uwagi oraz pytania do dyskusji :

1. Jak można odnieść model zwierzęcy bez makrofagów w kontekście zdolności organizmu do kompensacji? Jakie potencjalnie komórki/procesy mogą przejąć rolę makrofagów w wątrobie ?
2. Strona 22: jest „..... fenestracjami (średnica od 50 do 200 nm), tworzą swoiste sito umożliwiające transport substancji pomiędzy naczyniem a hepatocytami” to swoiste sito nie dotyczy substancji a raczej makromolekuł i agregatów. Prośba o komentarz jaki rodzaj tych makromolekuł ma zdolność przenikania ?
3. Strona 22: co oznacza termin „homeostaza immunologiczna i metaboliczna – homeostaza ma wymiar ilościowy (ciśnienie osmotyczne, pH itp.)?”
4. Strona 26: niezręczne stwierdzenie „Ta unikalna zdolność hemoglobiny do zmiany konformacji w celu przyłączenia tlenu nazywana jest kooperatywnością i pozwala na efektywne wiązanie O_2 ” Co jest skutkiem a co przyczyną ?
5. Strona 27: stwierdzenie „.....nekrozę erytrocytów, co jest zjawiskiem naturalnym pod koniec cyklu życia każdego erytrocytu” nie wydaje się być prawdziwe.
6. Strona 28: stwierdzenie „hem inkorporuje się w błony komórkowe i lipoproteiny, gdzie wywołuje peroksydację lipidów prowadząc do uszkodzenia tkanek nie wydaje się prawdziwe.
7. Strona 27-28: dobrze by było przedstawić rysunek hemoglobiny dla poprawienia opisu.
8. Strona 29: w przeprowadzonej dyskusji nie jest jasne co jest toksyczne, hem czy żelazo ?
9. Strona 31: stwierdzenie „ powodując krążenie żelaza niezwiązanego z transferyną (głównie Fe^{3+}), które jest wysoce toksyczne”, nie wydaje się prawdziwe.
10. Strona 32 „ jak należy rozumieć stwierdzenie „Proces makropinocytozy jest indukowany przez marszczenie się błony komórkowej.....” Co jest skutkiem a co przyczyną?

11. Strona 32 „co znaczy stwierdzenie „Zamiast tego makropinosomy są zazwyczaj znakowane znacznikami fazy płynnej”?
12. Brak jest wskazania, że obecność PS (fosfatydyloseryny) na zewnętrznej części błony plazmatycznej jest sygnałem skutkującym usunięciem erytrocytów.
13. Strona 36: w opisie przydałoby się wskazać skąd w opisanym procesie pozyskiwana jest hemoglobina.
14. Strona 37: w opisie koniugacji białek z fluoroforem wskazano na obecność detergentu Tween 20. Jaki jest cel stosowania detergentu?
15. Strona 39: metoda 3.6.2: Co jest podstawą selektywnej lizy erytrocytów?
16. Strona 46: punkt 3.10. Immunofluorescencja: czy stosowanie Tritonu nie powoduje zmiany dystrybucji białek błonowych?
17. Strona 66: co oznacza pojęcie homeostaza wątroby?

Język i formalna strona rozprawy

Przedstawione zagadnienia opisano w sposób zrozumiały i rzeczowy, jednocześnie wyczerpujący. Korekty wymaga konstrukcja niektórych zdań oraz błędy literowe. Materiały źródłowe w sposób właściwy potwierdzają stawiane tezy. Wyniki w postaci wykresów przygotowane są starannie i zawierają niezbędne informacje. Od strony formalnej praca spełnia wszystkie wymogi stawiane obecnie rozprawom doktorskim.

Wnioski

Przedstawione w recenzji uwagi i zapytania nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej opinii na temat pracy. Na podstawie przeprowadzonej oceny pracy, stwierdzam iż rozprawa doktorska mgr Zuzanny Sas pt. „Identyfikacja i zbadanie nowego mechanizmu wychwytu wolnej hemoglobiny w wątrobie u myszy” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wykazanie zdolności wychwytu wolnej hemoglobiny, przez inny niż dotychczas poznany mechanizm. Zaprezentowana praca wykazuje iż mgr Sas posiada bardzo szeroką wiedzę w dyscyplinie nauk medycznych oraz potwierdza jej umiejętności do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Tym samym spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm.).

Na szczególne wyróżnienie zasługują:

- szeroki wachlarz zastosowanych metod badawczych zarówno w zakresie technik biologii komórki jak i technik obrazowania w metodach in-vitro oraz in-vivo
- ważny i aktualny temat pracy badawczej
- kompleksowe ujęcie tematu z systematycznymi badaniami, uwzględniającymi wszystkie doświadczenia kontrolne
- umiejętność samodzielnego formułowania wniosków

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi zapisane w w/w ustawie i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję o wyróżnienie pracy.

dr hab. inż. Magdalena Przybyło, prof. PWr