

Akceptuję  
HJW

Wrocław, 25.03.2024

dr hab. inż. Magdalena Przybyło, prof. PWr  
Politechnika Wroclawska  
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 śledzionie. 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<sub>2</sub>” 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<sup>3+</sup>), 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