

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

www.biotech.uni.wroc.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl/zmm

Wrocław, 16.08.2023

Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Ortmann pt.:
„Interakcje pomiędzy pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EV) a
neutrofilowymi sieciami zewnątrzkomórkowymi (NET) podczas sepsy”

Zapalenie ogólnoustrojowe (sepsa) jest reakcją organizmu na czynnik zakaźny, którym najczęściej jest lipopolisachard (LPS). Co roku na całym świecie umiera około 11 milionów ludzi z powodu sepsy. Mechanizm sepsy jest złożony i wielopłaszczyznowy. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) są ważnymi mediatorami zapalnymi zaangażowanymi w komunikację międzykomórkową. Podczas zapalenia ogólnoustrojowego wykazują one szerokie spektrum działania związane z takimi procesami jak apoptoza, krzepnięcie czy też usuwanie patogenów. Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe (NET), podobnie jak pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, są uwalniane do krwi i/lub tkanek. Postuluje się, że wzajemne oddziaływania pomiędzy zewnątrzkomórkowymi pęcherzykami a neutrofilowymi sieciami zewnątrzkomórkowymi jest istotne w przebiegu sepsy. Niemniej jednak, mechanizmy molekularne leżące u podstaw interakcji między EV a NET są słabo poznane. Ponadto, nie opisano dotychczas metody systemowego obrazowania przyżyciowego umożliwiającej bezpośrednio śledzenie wyrzutu mikropęcherzyków (MP) w trakcie sepsy. Dlatego podjęcie badań w ramach recenzowanego doktoratu było w pełni uzasadnione.

Oceniana rozprawa doktorska ma klasyczny układ, typowy dla tego typu opracowań. We „Wstępie”, liczącym ponad 20 stron, wyczerpująco opisano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, jaki i neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe oraz ich rolę w sepsie. Na zakończenie Wstępu Doktorantka porównała pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z neutrofilowymi sieciami zewnątrzkomórkowymi. „Wstęp” stanowi solidne kompendium wiedzy, ale moim zdaniem powinien być napisany w sposób bardziej syntetyczny, a przede wszystkim powinien zawierać więcej rycin/schematów. Istnieje wiele dobrych artykułów przeglądowych zwłaszcza na temat neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych, z których można zaczerpnąć odpowiednie ryciny.

Podrozdział „Cel pracy” wystarczyłoby zakończyć na przedstawionych hipotezach badawczych. Umieszczanie w „Celu pracy” ośmiu cząstkowych technicznie brzmiących celów niekoniecznie powinno mieć miejsce w tym rozdziale rozprawy doktorskiej. Ponadto, nie

jestem pewna, czy sformułowanie „Mikroskopia przyżyciowa (*in vivo*) pozwala na obserwacje wyrzutu MP podczas zapalenia ogólnoustrojowego w naczyniach krwionośnych myszy” można nazwać hipotezą badawczą.

W rozdziale „Materiały i metody”, Doktorantka skrupulatnie opisała metody przygotowania materiału biologicznego do obserwacji mikroskopowych. Jej staranny opis pozwoli przyszłym badaczom bezproblemowo powtórzyć tego rodzaju eksperymenty. Godny podkreślenia jest bogaty i nowoczesny warsztat pracy Doktorantki, co z pewnością wymagało znacznego nakładu pracy i wysiłku. Doktorantka wykorzystała najnowsze techniki mikroskopii przyżyciowej umożliwiające obserwacje w czasie oraz metodę analizy nanocząsteczek (NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*), pozwalająca na precyzyjną analizę rozmiarów i stężeń pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

W rozdziale "Wyniki" zaprezentowano imponującą liczbę rycin – ponad 30 (niektóre z nich mogłyby zostać załączone w końcowym rozdziale rozprawy doktorskiej jako Dodatek). Zarówno liczba rycin, jak i różnorodność metod badawczych są świadectwem ogromnej pracy, jaką Doktorantka włożyła w przygotowane rozprawy doktorskiej. Starannie opracowane protokoły doświadczeń z wykorzystaniem nowych technik badawczych z pewnością będą przydatne dla przyszłych doktorantów prof. Elżbiety Kołaczkowskiej. Uważam jednak, że podrozdziały powinny kończyć się wnioskami, a przejścia pomiędzy kolejnymi podrozdziałami powinny być płynne. Opis uzyskanych wyników powinien być prowadzony w taki sposób, aby czytelnik miał świadomość, że doświadczenia przedstawione w kolejnych podrozdziałach są logiczną konsekwencją wyników zaprezentowanych w poprzednich podrozdziałach.

Rozprawa doktorska tradycyjnie kończy się rozdziałem „Dyskusja”, w którym Doktorantka omawia własne wyniki w kontekście literatury przedmiotu. Ten rozdział jest obszerny i można by go nieco skrócić, a przede wszystkim podzielić na podrozdziały, zatytułowane odpowiednio w formie wniosków. Takie uporządkowanie rozdziału „Dyskusja” znacząco ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie treści oraz swobodne nawigowanie po tym rozdziale. Ponadto, w tym rozdziale Doktorantka powinna zawrzeć graficznie podsumowanie uzyskanych wyników, ponieważ „*A picture is worth a thousand words*”. W związku z tym, proszę Doktorantkę o przedstawienie schematu/rysunku syntetycznie podsumowującego uzyskane wyniki. Lektura „Dyskusji” ukazuje doskonałą znajomość literatury przedmiotu oraz dojrzałość naukową Doktorantki, a także zdolność do rzetelnej analizy własnych wyników w kontekście literatury przedmiotu. Biorąc pod uwagę złożoność procesów zachodzących podczas sepsy, jest to niełatwe zadanie.

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym i zawiera sporadyczne błędy. Na przykład, na stronie 100 zamiast terminu „figura” powinno zostać użyte słowo „rysunek” lub „rycina”, natomiast zamiast „nadekspresja białka” powinno być „nadprodukcja białka”, nie sensu pisać o analizach w „czasie rzeczywistym” wystarczy w „czasie”.

Ponadto chciałabym zwrócić uwagę na kilka drobnych kwestii merytorycznych:

1. Str. 55 i dalsze, nie ma potrzeby podawania wymiarów MP do po przecinku (np. 91,8 nm), ponieważ aparat NanoSight mierzy cząsteczki o wymiarach powyżej 10 nm.
2. Rycina 4 oraz inne ryciny; tytuł ryciny "Kinetyka stężenia/liczby..." wydaje się niezbyt fortunny, powinien brzmieć „Dynamika zmian stężenia/liczby....”.
3. Rycina 4, gdzie znajdują się wyniki dla zdrowych myszy, a gdzie dla myszy potraktowanych LPS?
4. Rycina 6, ile łącznie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zostało poddanych analizie?
5. Rycina 9 i inne ryciny, niezbyt fortunate sformułowanie tytułu ryciny „Kinetyka powierzchni...”.
6. Rycina 34, poziom beta-aktyny nie zawsze jest jednakowy w analizowanych ścieżkach (panele B i E). Czy były robione kontrole „ładowania” białek i kontrola transferu białek. Jest to istotne zwłaszcza w przypadku białek o dużej masie cząsteczkowej (np., panel D, 185 kDa).
7. Str. 102, „...wątroba jest....największym organem immunologicznym...”, a jelita przewodu pokarmowego?
8. W trosce o środowisko doktorat powinien być wydrukowany dwustronnie.

Za najcenniejsze osiągnięcia pani Weroniki Ortmann uważam:

- **Stworzenie solidnego, nowoczesnego warsztatu badawczego, umożliwiającego wizualizację mikropęcherzyków w naczyniach mięśnia dźwigacza jądra oraz sinusoid wątroby myszy podczas sepsy.**
- **Wykazanie, że mikropęcherzyki pełnią rolę bioaktywnych nośników cząsteczek pro- oraz przeciwzapalnych, które służyć mogą do kontrolowanej modyfikacji odpowiedzi odpornościowej zarówno w podczas sepsy, jak i w innych stanach patologicznych.**

Chciałabym jeszcze podzielić się kilkoma uwagami/pytaniem natury bardziej ogólnej i poprosić Doktorantkę o odniesienie się do nich.

1. Powszechnie wiadomo, że nie każdy wynik uzyskany na modelu mysim da przenieść się na człowieka. W związku z tym proszę Doktorantkę o odpowiedź na pytanie: Na ile można uzyskane wyniki na modelu mysim ekstrapolować na ludzi?
2. W jaki sposób uzyskane przez Panią wyniki mogą przyczynić się w przyszłości do walki z sepsą?
3. Proszę o wskazanie jednego z siedmiu wniosków końcowych jako najważniejszy i o uzasadnienie, dlaczego Pani tak uważa.
4. Proszę o krótkie przedstawienie dalszego kierunku badań nad rolą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w sepsie.

Osiągnięcia pani Weroniki Ortmann są nie tylko oryginalne, ale także interesujące. Mam nadzieję, że wkrótce zostaną opublikowane. Warto zwrócić uwagę na to, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały uzyskane w ramach projektu Preludium NCN, którego kierowniczką była Doktorantka, co jest kolejnym dowodem dojrzałości naukowej pani Weroniki Ortmann.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani Weroniki Ortmann spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Weroniki Ortmann do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jolanta Zakrzewska