



Prof. dr hab. Maria Anna Kowalska
Pracownia Sygnalizacji Komórkowej
Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Łódź, 31 lipca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Weroniki Ortmann pt.

„Interakcje pomiędzy pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EV) a neutrofilowymi sieciami zewnątrzkomórkowymi (NET) podczas sepsy”

Sepsa (posocznica) czyli zapalenie ogólnoustrojowe jest słabo poznaną reakcją organizmu na różnego rodzaju infekcje i nadal prowadzi do dużej ilości zgonów. Jakkolwiek na przestrzeni ostatnich lat odnotowuje się spadek ilości zgonów na sepsę brak specyficznej terapii utrudnia leczenie pacjentów a u pacjentów którzy przeżyli sepsę występuje często trwale uszkodzenie narządów oraz niepełnosprawność. Przebieg sepsy regulowany jest mediatorami zapalnymi wydzielanymi głównie przez leukocyty dlatego też podjęcie badań mających na celu określenie oddziaływania patogenu z komórkami (głównie neutrofilami) oraz z bioaktywnymi strukturami wydzielanymi przez te komórki może pomóc w zrozumieniu złożonej natury zapalenia ogólnoustrojowego i prowadzić do rozszerzenia metod diagnostycznych oraz terapeutycznych. Rozprawa Pani mgr Weroniki Ortmann niewątpliwie wpisuje się w ten obszar badawczy. Koncentruje się bowiem na oddziaływaniu patogenów ze strukturami neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET), które mają bakteriobójcze właściwości i zapobiegają rozprzestrzenianiu się patogenów, oraz na wpływie struktur wydzielanych przez różnorodne komórki znanych jako pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) na tworzenie NETs a co za tym idzie na modulację ich aktywności i skuteczności.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana pod promotorstwem dr. hab. Elżbiety Kołaczekowskiej, prof. UJ w Pracowni Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych. Praca jest obszerna, liczy 158 stron, w tekście zamieszczono 36 rycin (ostatnia nazwana jest nie wiadomo dlaczego „Figurą”) i cytowano 262 pozycje literaturowe.

Rozprawa Pani mgr Weroniki Ortmann ma typowy dla tego typu opracowań układ. We „Wstępie” (26 stron) opisane i ilustrowane są informacje dotyczące problemu chorobowego sepsy, opis oraz schematyczne przedstawienie EVs - różnorodnych struktur uwalnianych z komórek oraz ich rola w zapaleniach ustrojowych a także informacje dotyczące neutrofilii (czasem nazwanych PMN), ich funkcji oraz procesu tworzenia NETs - neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych oraz funkcji NETs. Hipotezy i cele badawcze rozprawy są przedstawione w sposób przejrzysty a wybór modelu eksperymentalnego uważam za słuszny a zarazem interesujący do realizacji celów badawczych w ramach tej pracy doktorskiej. W poszczególnych rozdziałach rozprawy Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań.

Techniki wykorzystane przez Doktorantkę są szczegółowo opisane w części „Materiały i metody” (17 stron). Mam do tej części jednak parę zastrzeżeń. „Model zapalenia ogólnoustrojowego” opiera się tutaj na dootrzewnym podaniu lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS) w dawce 1 mg na kg masy ciała myszy. W moim przekonaniu przy tej dawce trudno mówić, że wywołana jest „endotoksemia”. W przedstawionych wynikach nie ma wzmianki na temat odpowiedzi myszy po podaniu LPS – czy myszy te miały jakiegokolwiek objawy chorobowe, zmiana temperatury ciała, zwiększoną liczebność neutrofilii, zmiany w poziomach cytokin itp. Przy takich dawkach mówi się raczej o stresie wywołanym przez LPS (LPS-challenged mice) czyli wczesnej fazie zapalenia (early phase of inflammation) a nie o zapaleniu ogólnoustrojowym (LPS-induced sepsis) który wywoływany jest przez znacznie wyższe dawki LPS (25-35 mg/kg) i gdzie obserwuje się ok. 50% przeżywalności. W jednej z prac cytowanych przez autorkę (Bao et al. 2022) rozróżnienie to jest niezwykle jasne. Poza tym, model podania LPS nie jest najlepszym modelem sepsy/posocznicy wywoływanej w modelu mysim. Myszy są znacznie odporniejsze na działanie LPS niż ludzie. Nie jest to również model w którym bakterie byłyby wylapywane przez neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowych (NET). Jakkolwiek model ten był przez długie lata (również przeze mnie, ale 20 lat temu) wykorzystywany przez naukowców do badań nad sepsą, obecnie stosuje się często wspomniany w pracy przez autorkę model sepsy wywołany przez podwiązanie i przekłucie

jelita grubego (CLP), podanie dootrzewne zawiesiny kałowej (cecal slurry) oraz inne modele np. spontanicznej sepsy u psów.

Niemniej jednak techniki stosowane przez autorkę rozprawy są adekwatne do wytyczonych zadań. Adekwatne do wytyczonych zadań są również wyniki przedstawione w dalszej części pracy (strony 55-100). W pierwszej części wyników autorka przedstawia kinetykę stężenia mikropęcherzyków w płynie otrzewnym oraz krwi pobranej z myszy poddanych działaniu LPS (Ryc. 4-5). Trudno jest jednak porównywać stężenie mikropęcherzyków w 1 mL płynu otrzewnowego uzyskiwanego po dostarczeniu 1,5 mL soli fizjologicznej do brzucha myszy z 1 mL plazmy otrzymanej z krwi pobranej z serca myszy. W tym miejscu chciałabym również zwrócić uwagę, że pobieranie krwi z serca myszy jest metodą w której występuje wysoka aktywacja płytek krwi i, co za tym idzie, tworzenie płytkowych mikrocząsteczek, które, jakkolwiek niewidoczne w mikroskopie przeźyciowym, dominowały w oznaczeniach cytometrycznych. W dalszej części rozprawy wyniki zawierają dużą ilość przeźyciowych zdjęć mikroskopowych z których, za pomocą specyficznych przeciwciał, autorka szacuje ilość i zakres rozmiarów różnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w naczyniach krwionośnych, szacuje oddziaływanie tych pęcherzyków z neutrofilowymi sieciami zewnątrzkomórkowymi. W drugiej a raczej trzeciej części rozprawy przedstawione są wyniki „ex vivo” pokazujące wpływ pęcherzyków izolowanych z krwi oraz płynu otrzewnowego na wyrzut NETs, również w obecności inhibitora tego wyrzutu. Badany był również wpływ mikropęcherzyków na aktywność makrofagów (linia komórkowa). Autorka przedstawia dużą ilość wyników (rycin) szczegółowo opisanych. Brak jest jednak dla mnie krótkiego opisu wniosków wyciąganych z poszczególnych eksperymentów przedstawionych na rycinach, które następnie powiązane w całość dawałyby istotny merytoryczny aspekt wyników. Lakonicznie opisana jest również tak zwana „liczba n”, określona we wszystkich przypadkach jako $n \geq 3$. Obszerna dyskusja (25 stron, która przypomina pracę przeglądową), pokazuje znajomość tematu w jakim obracają się badania Pani mgr Weroniki Ortmann. Z dyskusji wynika również, że wnioski wyciągnięte z badań Autorki korelują z badaniami wielu naukowców zajmującymi się tematyką mikrocząsteczek oraz przebiegu sepsy, również u pacjentów z różnymi typami urazów.

Niezależnie od pytania, czy przedstawione w rozprawie wyniki odzwierciedlają mechanizmy występujące podczas ogólnoustrojowego zapalenia jakim jest sepsa, co wg. mnie może być przedmiotem dyskusji, uważam że Pani mgr Weronika Ortmann wykonała dużą serię dobrze zaplanowanych eksperymentów wykorzystując nowoczesne techniki badawcze. Rozprawa prezentuje opis zaawansowanych technik mikroskopowych dostępnych w niewielu ośrodkach

w Polsce, które powinny jak najszybciej znaleźć powszechne zastosowanie, które prowadziłyby do łatwiejszego rozpoznania zapaleń ogólnoustrojowych i ułatwiałyby wybór metod leczenia. Widać, że Doktorantka doskonale opanowała te techniki i będzie w najbliższym czasie mogła stosować je w dalszych badaniach nad wybranym przez siebie tematem związanym z sepsą lub inną jednostką chorobową w której mikrocząsteczki uwalniane przez komórki odgrywają ważną, a nie poznaną dotychczas rolę (np. w procesie przerzutów rakowych). Mam nadzieję, że Doktorantka przyjmie moje uwagi jako wskazówki, przydatne w jej dalszej karierze naukowej oraz przy przygotowaniu materiału zawartego w rozprawie do druku.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Weroniki Ortmann napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę praktyczną oraz teoretyczną, dążeniem do rozwiązywania problemów o charakterze aplikacyjnym oraz umiejętność interpretacji wyników i wyciągnięcia z nich wniosków. Moje uwagi mają w dużej mierze charakter marginalny lub polemiczny i nie umniejszają wartości rozprawy, która spełnia wymagania określone w art. 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. Nr65, poz. 595 z 2005r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455).

A zatem zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Ortmann do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

