

Dr hab. inż. Jarosław Śmieja, prof. nzw. Pol.Śl.  
Instytut Automatyki  
Politechnika Śląska w Gliwicach

### Recenzja rozpraw doktorskiej

Tytuł rozprawy: **Modelowanie oscylacji stężeń jonów wapniowych w komórkach eukariotycznych z uwzględnieniem obszarów bezpośredniego kontaktu pomiędzy mitochondriami a retikulum endoplazmatycznym.**

Autor rozprawy: **mgr. Michał Dyzma**

Promotor: dr hab. Bogdan Kaźmierczak

#### 1. Zagadnienia naukowe rozpatrywane w pracy i jej charakter.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma charakter teoretyczny i dotyczy analizy oscylacji stężeń jonów wapniowych w komórkach eukariotycznych, a w szczególności znaczenia obszarów bezpośredniego kontaktu pomiędzy mitochondriami (M) a retikulum endoplazmatycznym (RE) dla powstawania i typów tych oscylacji. Przedstawione zostały dwa typy modeli. Pierwszy z nich opisuje zjawiska przestrzenne za pomocą równań reakcji-dyfuzji. Rozchodzenie się sygnału wapniowego zostało tu przedstawione jako fala biegnąca. Przedyskutowano pewne efekty związane ze sprzężeniami mechanochemicznymi. Drugi typ modeli oparty jest na opisie zjawisk za pomocą równań różniczkowych zwyczajnych. Przedstawiono założenia, które pozwalają pominąć efekty przestrzenne i przedstawić dwa alternatywne modele opisujące dynamikę zmian średnich stężeń jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki.

Podstawowym celem pracy, jawnie przedstawionym w rozprawie, było "zbadanie wpływu obszarów bliskiego sąsiedztwa pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a mitochondriami na gospodarkę wapniową w komórkach eukariotycznych". Z treści pracy wynika, że niejawną hipotezę mogłaby być postawiona w następujący sposób: Kontrola przepływu jonów wapnia pomiędzy M i RE jest jednym z ważniejszych mechanizmów decydujących o powstawaniu i charakterze oscylacji stężeń tych jonów w komórce. Uważam, że przeprowadzone eksperymenty numeryczne potwierdziły słuszność tej hipotezy.

Otrzymane wyniki rozszerzają istniejący stan wiedzy na temat działania mechanizmów regulujących gospodarkę wapniową w żywych komórkach. Należy stwierdzić, że rozpatrywane w rozprawie problemy są aktualne i dobrze wpisują się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych. Warto podkreślić, że w pewnym zakresie stanowią częściową realizację jednego z kierunków badań zaproponowanych w pracy (Williams GSB et al. PNAS, 2013 Jun 25; 110(26): 10479–10486), w której stwierdzono, m.in., że należy "Reexamine  $Ca^{2+}$  influx and efflux from mitochondria in intact cells to provide quantitative information under both physiological and pathophysiological conditions". Szkoda, że wyniki opublikowane w wymienionej pracy nie zostały wykorzystane w rozprawie.

#### 2. Analiza źródeł

Spis literatury zawiera 310 pozycji. Duża ich liczba pochodzi z ostatnich kilku lat. Wydaje się, że można było ograniczyć tę listę, zwłaszcza, że część pozycji jest wzmiankowana jedynie w części wprowadzającej podstawy biologiczne w zbyt szczegółowym zakresie i w zasadzie nie jest istotna z punktu widzenia celów realizowanych w rozprawie (patrz również uwaga 8.1). Z

drugiej strony, tak obszerna lista świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktoranta w aktualnej literaturze światowej.

### 3. Poprawność założeń i rozwiązań

Należy stwierdzić, że modele omawiane w rozprawie, przyjęte w nich założenia oraz metody matematyczne i obliczeniowe, wykorzystane do wykazania poprawności sprawdzanych hipotez są poprawne.

### 4. Oryginalność rozprawy

Rozprawa została oparta na trzech pracach, których Doktorant był współautorem, opublikowanych w czasopismach naukowych z listy JCR, załączonych do rozprawy. Wykorzystane zostały w niej standardowe metody konstruowania i analizy modeli, same modele jednak są niewątpliwie oryginalne. Pewną trudność stanowi natomiast określenie, co jest samodzielnym dorobkiem Autora, ponieważ wszystkie prace są współautorskie, w dostarczonej dokumentacji brakuje oświadczeń współautorów. Zakładając (biorąc pod uwagę fakt, że Doktorant jest pierwszym autorem jednej z prac, a w drugiej analizowany jest model zmodyfikowany w stosunku do niej), że Doktorant znacząco przyczynił się do skonstruowania i analizy modeli, do szczególnie wartościowych, oryginalnych elementów rozprawy, istotnych z naukowego punktu widzenia należy zaliczyć:

- wykazanie znaczenia przepływu jonów wapnia pomiędzy M i RE dla powstawania i charakteru oscylacji stężeń tych jonów w komórce.
- (w mniejszym stopniu) opracowanie modelu pozwalającego na analizę wpływu fal wapnia na zmiany w strukturze mechanicznej komórki;

### 5. Sposób przedstawienia wyników

Struktura rozprawy jest logiczna, a wyniki przedstawione zostały w czytelny sposób. Niemniej jednak wydaje się, że niepotrzebnie dużo miejsca zajmuje wstęp biologiczny, zawarty w Rozdziale 1. Duża część przedstawionych tam faktów (np. szczegóły dotyczące struktury białek) nie ma żadnego znaczenia w kontekście modeli analizowanych w rozprawie. Z drugiej strony, pewien niedosyt pozostawia sposób porównania modeli w Rozdziałach 4 i 5, a także brak analiz wykraczających poza to, co zostało już opublikowane w załączonych pracach. Na dobrą sprawę Rozdziały 3-5 zawierają prawie wyłącznie wyniki już opublikowane i szkoda, że ich analiza i interpretacja nie została poszerzona.

### 6. Słabe strony rozprawy

Do słabszych stron pracy należy przede wszystkim, wspomniany w poprzednim punkcie, brak wyjścia poza wyniki osiągnięte w opublikowanych pracach. Biorąc pod uwagę, że pierwsza z tych prac została opublikowana pięć lat temu, czyli prawdopodobnie na początku kariery naukowej Doktoranta, a dwie pozostałe omawiają podobne do siebie modele, wydaje się, że ich potencjał został wykorzystany jedynie w minimalnym stopniu. Między innymi, zwraca uwagę swego rodzaju zawieszenie w próżni modelu przestrzennego (patrz również uwaga 8.3). Poza wykazaniem (w standardowy sposób), że przy pewnych założeniach można go zastąpić modelem w postaci układu równań różniczkowych zwyczajnych, właściwie nie ma on większego związku z kolejnymi modelami. Jest to oczywiście subiektywna opinia; można z nią polemizować, twierdząc, że pokazuje to szeroki zakres zainteresowań Doktoranta, który zajmuje się różnorodnymi tematami, mającymi ze sobą punkty stykowe.

Drugim zarzutem, który można tu podnieść, jest brak porównania wyników symulacji do danych eksperymentalnych dostępnych w literaturze (poza dość ogólnymi stwierdzeniami w treści pracy). Należałoby pokazać, które oscylacje prezentowane w pracy, są zgodne, a które

nie są, z takimi danymi. Literatura jest tu dość obszerna (zresztą część prac jest cytowana w recenzji, poza tym można było sięgnąć do wielu innych, np. Dolensek et al., *PLoS One*. 2013; 8(12): e82374; Satoh et al., *J Biol Chem*. 2011 Jun 10; 286(23): 20591–20599; Kwan et al., *J Neurophysiol*. 2010 Dec; 104(6): 3323–3333; inne prace, które są nawet cytowane w rozprawie).

Innym mankamentem pracy jest brak przeprowadzenia bardziej formalnej analizy wrażliwościowej modeli przedstawionych w Rozdziałach 4 i 5.

#### 7. Co wniosła rozprawa do nauki?

Praca wnosi zauważalny wkład w dynamicznie rozwijającą się dziedzinę wiedzy, jaką jest biologia systemów. Wykazano w niej, że bezpośrednie przepływy retikularno-mitochondrialne w kompleksach MAM mają istotny wpływ na istnienie, charakter i okres oscylacji stężeń jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki. Może się to wydawać niewielkim wkładem, ale w tej konkretnej dziedzinie wiedza zdobywana jest właśnie w sposób fragmentaryczny, a cząstkowe wyniki są dopiero w kolejnym etapie badań integrowane w spójny obraz mechanizmów regulujących istotne procesy życiowe. Pozwala to przybliżyć się do pełniejszego zrozumienia mechanizmów regulujących procesy wewnątrzkomórkowe, a w ostatecznym rozrachunku możliwości wykorzystania tej wiedzy w diagnostyce klinicznej i terapii.

#### 8. Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Poniższe uwagi nie mają wpływu na ostateczny wniosek postawiony w niniejszej recenzji. Niemniej jednak część z nich uważam za istotne w tym sensie, że Doktorant powinien się do nich odnieść w trakcie obrony (zwłaszcza 8.2 - 8.4)

- 8.1. Jak już wspomniano w punkcie 5 niniejszej recenzji, Rozdział 1, przybliżający podstawy biologiczne jest nadmiernie rozbudowany; świadczy co prawda o odczuciu Autora, ale wiele informacji tam podanych nie jest potrzebne do poprawnego skonstruowania modelu bądź interpretacji otrzymanych wyników symulacyjnych (np. szczegóły dotyczące szlaków sygnałowych, budowy poszczególnych białek, receptora ryadynowego itp.). W efekcie pojawiają się powtórzenia (np. dwa razy zostało zdefiniowane pojęcie symportu w tym samym akapicie - str 2/3). Należało raczej pogłębić analizę zaproponowanych modeli
- 8.2. Jak już wspomniano w punkcie 6 niniejszej recenzji, brakuje w pracy bezpośredniego zestawienia przykładowych wyników symulacji z danymi eksperymentalnymi;
  - 8.2.1. Czy udało się uzyskać, np., oscylacje zgodne z wynikami przedstawionymi na rys. 1.9 rozprawy?
  - 8.2.2. Czy/w jaki sposób można w proponowanych modelach uzyskać odpowiedzi układu zgodne z cytowanymi na str. 59 wynikami?
  - 8.2.3. Czy/w jaki sposób można pokazać, że dezaktywacja RaM zachodzi w czasie krótszym niż 0.75 s (str. 68)?
- 8.3. Model przedstawiony w Rozdziale 3 prowadzi do bardzo interesujących i trudnych, w ogólnym przypadku, problemów matematycznych. Z tego względu w opublikowanej pracy rozważono jedynie "nieskończone" struktury geometryczne, w których rozchodzi się fala wapnia. Dużo ciekawsze byłoby sprawdzenie (przynajmniej numeryczne), co dzieje się w przypadku ograniczonej przestrzeni, gdzie mogą się spotkać czoła fal biegnących, w najprostszym przypadku, z przeciwnych kierunków.
- 8.4. Różnice pomiędzy modelami #2 i #3 mogłyby być dokładniej przedyskutowane:
  - 8.4.1. Na str. 103 można znaleźć stwierdzenie: "W przeciwieństwie do Modelu #1, w Modelu #2 nie uwzględniono wpływu stężenia jonów wapnia w cytozolu na jego

- wpływ z mitochondriów poprzez czynnik [...]". Jest to dość istotna zmiana, nie przedstawiono jednak przesłanek za nią stojących.
- 8.4.2. W efekcie wprowadzonych zmian Model #2 nie przejawia zachowań chaotycznych w przeciwieństwie do modelu #1. Z drugiej strony możliwość wystąpienia drgań chaotycznych (w dodatku innych zachowań) miała być zaletą Modelu #1. Czy w związku z tym Autor uważa, że układ biologiczny, jakim jest żywa komórka, powinien/może charakteryzować się możliwością wystąpienia takich zachowań?
- 8.5. Wydaje się, że praca mogłaby zyskać na wartości, gdyby pewne założenia zostały jawnie przedstawione
- 8.5.1. W jaki sposób model uniportera został wykorzystany do uzyskania zależności opisującej  $J_{in}$  w modelu 2 ((2.9) na str. 68 i str. 126)
- 8.5.2. Równania (2.16)-(2.17) zostały napisane przy założeniu buforowania pojedynczych jonów wapnia przez białka buforowe, podczas gdy w Tabeli 1.5 można zauważyć bardziej złożone systemy buforowe. Jak należałoby zmodyfikować te równania w celu uzyskania opisu, uwzględniającego buforowanie większej liczby jonów przez pojedyncze białko buforowe?
- 8.5.3. Czy w modelach #1 i #2 założono, że wymiennik mNCX nie ma znaczenia dla dynamiki obserwowanych procesów? Jeśli tak, to jaki był cel umieszczenia w pracy zależności (2.10)? Poza tym, Nawet jeśli przyjąć, że stężenie jonów Na jest stałe, pominięcie tego wymiennika niekoniecznie musi być usprawiedliwione
- 8.5.4. W niektórych miejscach brak jest wyjaśnienia oznaczeń, co może prowadzić do nieporozumień - np.  $\gamma_c$  w (2.23) oznacza stężenie jonów wapnia w cytozolu (chyba), podczas gdy w (2.22) pojawia się  $\gamma$  (co prawda bez indeksu), w oczywisty sposób oznaczająca coś innego. Podobnie na samym początku w tablicy 1.3. pojawia się "stężenie jonów w macierzy zewnątrzkomórkowej?" - czy to jest średnia dla różnych tkanek? Jeśli tak, to jaka jest wariancja?
- 8.6. W pracy pojawiają się miejscami pewne potoczne sformułowania, dopuszczalne w dyskusjach pomiędzy badaczami, lecz takie, których należałoby unikać w rozprawie doktorskiej, np. "oś x-ów" na str. 85 lub
- 8.6.1. *"współczynnik dyfuzji wapnia istotnie mniejszy od średnicy komórki"* (str. 74) - przecież te dwie wielkości mają inne wymiary - jak je można porównywać?
- 8.6.2. *"W wielu przypadkach oscylacje wapniowe nie są zjawiskiem regularnym, lecz pojawiają się w sposób chaotyczny"* - co oznacza "chaotyczne pojawianie się" - czy jest to traktowane jako synonim chaotycznej dynamiki pojawiającej się w układzie w sposób stochastyczny?
- 8.7. Technika pisania pracy i błędy edycyjne:
- 8.7.1. W Założeniu 4 na str. 91 pojawia się odniesienie do Tabeli 1 - jednak albo tej tabeli nie ma w pracy, albo numer powinien być inny. W efekcie stwierdzenia o spełnieniu (3.42) nie można zweryfikować.
- 8.7.2. Sformułowania rozmiągające się z prawdą, np. "Podobnie jak w przypadku reakcji enzymatycznych, transport z udziałem pompy wapniowej odbiega od prawa działania mas. Dokładniej, prędkość przepływu jonów wapnia  $V$  w poprzek błony biologicznej opisuje się najczęściej wzorem Michaelisa-Menten [...]" - przecież kinetyka M-M jest wprowadzana z prawa działania mas!
- 8.7.3. W przypadku przedstawiania modeli w postaci równań różniczkowych cząstkowych, wydaje się właściwym przedstawianie warunków brzegowych za każdym razem, a nie tylko dla końcowych równań, wykorzystywanych w pracy (choć to pewnie subiektywna opinia) - patrz np. model dany przez (2.16)-(2.17) lub (3.1)

- 8.7.4. W niektórych miejscach brak odnośników literaturowych - np. przed równaniem (2.6), w stwierdzeniu o wartościach współczynnika  $p$  dla większości komórek (str. 104)
- 8.7.5. Brak starannej korekty edytorskiej: Koślawe zdania, np. "Główną siłą napędową funkcjonowania uniportera jest gradient elektrochemiczny w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, zwany  $\Delta\Phi$ " (chyba oznaczony?) - str. 46; " $J_{ch}$  to wypływ jonów wapnia przez kanały wapniowe z ER do cytozolu,  $J_{pump}$  napływ jonów wapnia do ER z cytozolu, oraz analogiczne prądy wapniowe realizowane przez kanały i pompy wapniowe na powierzchni błony komórkowej" (??)- str. 73, "Dla  $c_0 = 1000 \mu M$ " (podpis pod rys. 2.3)- to nie jest zdanie ani równoważnik zdania. Pojawiają się pozostałości po kopiowaniu z innych tekstów źródłowych (własnych) - np. Eq.(3.33) - str. 91.
- 8.7.6. Jeśli kreska nad oznaczeniem zbioru oznacza jego dopełnienie, to sposób zdefiniowania zbiorów rozłącznych na str. 78 zawiera błąd; Podobnie na str. 35 na dole jest "pięć, cztery i trzy podjednostki" - powinno chyba być "lub"?
- 8.7.7. Wprowadzanie pojęć, które nigdzie nie zostały wyjaśnione (np. "patch clamp" - str. 46, "stała półaktywacji pompy" - str. 38);
- 8.7.8. Niespójne bądź będące kalką językową nazewnictwo - "heliks" i "helisa", "precypitacja fosforanu wapnia", "konserwowane ewolucyjnie", "pozytywnie naładowany", "koncentracja" zamiast "stężenie" - to tylko wybrane przykłady
- 8.7.9. Pewien brak konsekwencji w podawaniu danych liczbowych - na str. 31 można przeczytać, że stężenie wapnia w mitochondriach waha się w granicach 50-500  $\mu M$ , podczas gdy dolna granica przedstawiona w Tabeli 1.4 wynosi 0.2  $\mu M$  w stanie spoczynkowym i 1  $\mu M$  w stanie aktywacji (poza tym, dlaczego pojawia się odniesienie do Rys.1.10?)

## 9. Ocena rozprawy

Uważam, że postawiony przez Autora cel został osiągnięty. Praca jest dowodem na to, że Autor posiada bardzo dobre rozeznanie w literaturze dotyczącej wybranego obszaru badań i potrafi konstruować i analizować modele różnego typu (PDE, ODE).

Reasumując, stwierdzam, że mgr Michał Dyzma wykazał się wiedzą i umiejętnościami wymaganymi do uzyskania stopnia doktora nauk technicznych w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna. Przedstawiona praca doktorska spełnia w dostatecznym stopniu wymagania stawiane pracom doktorskim przez *Ustawę o stopniach tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 roku (z późn. zmianami). Wnioskuje o dopuszczenie mgr Michała Dyzmy do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

