



Dr hab. inż., prof. uczelni Elżbieta Jastrzębska
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska
Ul. Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
elzbieta.jastrzebska@pw.edu.pl

Warszawa, dn. 9 września 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Macieja Białaska
pt. „**Mechanizm przekazywania ferrytyny z makrofagów do komórek
nowotworowych**”

(ang. „*Mechanism of ferritin transfer from macrophages to cancer cell*”)
wykonanej w Samodzielnej Pracowni Biologii Nowotworu, Instytutu Biologii,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Promotor: Pani prof. dr hab. Magdalena Król
Promotor Pomocniczy: Pani dr Paulina Kucharzewska-Siembieda

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska ma charakter monotematyczny i dotyczy szeroko pojętej tematyki chorób nowotworowych, które bez wątpienia są istotnym problemem społecznym oraz wyzwaniem dla medycyny. Doktorant w swej pracy podjął się badania mechanizmu transportu ferrytyny z makrofagów do komórek nowotworowych, który mógłby służyć jako skuteczny sposób dostarczania leków w proponowanej terapii przeciwnowotworowej. Podjęcie tego tematu przez Doktoranta wynika z faktu, iż makrofagi odgrywają coraz większą rolę jako potencjalne narzędzie do wykorzystania w komórkowych terapiach przeciwnowotworowych. Z kolei ferrytyna, wykazuje wysoką biokompatybilność i zdolność do pobierania przez makrofagi, co czyni ją atrakcyjnym nośnikiem dla leków.

Doktorant jako cel pracy postawił sobie potwierdzenie i scharakteryzowanie pobierania ferrytyny przez makrofagi, zbadanie transferu ferrytyny do różnych typów nowotworowych linii komórkowych oraz wyjaśnienie mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw procesu transferu.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma układ klasyczny. W jej skład wchodzi 1) przegląd literatury, 2) cel pracy zdefiniowany na podstawie przeprowadzonej analizy literatury, 3) część doświadczalna, na którą składają się materiały i metody oraz wyniki badań, 4) dyskusja i wnioski oraz 5) spis literatury (ponad 240 pozycji). Dodatkowo, praca zawiera spis treści i streszczenie. Całość pracy liczy 136 stron. Praca została napisana w języku angielskim i ubogacona wykresami, licznymi zdjęciami i rysunkami, a także tabelami. Od strony edytorskiej oceniam pracę bardzo dobrze.

Pierwszą część pracy stanowi część literaturowa będąca wprowadzeniem do tematyki badań podjętych przez Doktoranta i obejmuje ona 20 stron. Doktorant opisuje problem jaki stanowią nowotwory, złożoność mikrośrodowiska nowotworowego, w szczególności podkreślając rolę makrofagów. W części literaturowej pracy Autor podkreśla rolę komórek układu odpornościowego w terapii przeciwnowotworowej poprzez zastosowanie komórek CAR T, CAR NK, makrofagów oraz makrofagów indukowanych z komórek macierzystych. Ważne podkreślenia jest to, że Autor w przeglądzie literatury przedstawia nie tylko najnowsze badania prowadzone w zakresie immunoterapii komórkowej, ale również przedstawia przykłady prowadzonych prób klinicznych. Podkreśla to bez wątpienia istotę badań podjętych w ramach niniejszego doktoratu w aspekcie aplikacyjnym.

W dalszej części pracy Doktorant podkreśla rolę ferrytyny jako potencjalnego nośnika leków przeciwnowotworowych.

W celu postawienia takiej tezy, należałoby przedyskutować i porównać (a tego brakuje w tej części pracy) inne nośniki stosowane do celowanego wprowadzania związków do komórek nowotworowych.

Na stronie 27 Doktorant opisuje transfer, w którym makrofagi internalizują i przechowują HPt i mogą przenosić te cząsteczki do komórek nowotworowych w warunkach współhodowli. Doktorant wskazuje, że transfer ten (nazwany jako TRAIN) został opracowany przez zespół, w którym realizował pracę doktorską. Nasuwa się pytanie, czy było to elementem prac realizowanych w ramach pracy doktorskiej czy badań wstępnych, wcześniejszych zespołu. Prośba więc o wyjaśnienie tej kwestii.

Ostatni rozdział części literaturowej dotyczy opisu typów komunikacji międzykomórkowej, który odpowiedzialny może być za transfer białek pomiędzy makrofagami a komórkami nowotworowymi. Rozdział ten jest bardzo istotny, znajduje one swoje odzwierciedlenie w części eksperymentalnej pracy, związanej z poszukiwaniem mechanizmu transferu molekuł pomiędzy makrofagami a komórkami nowotworowymi. W mojej ocenie brakuje krótkiego rozdziału podsumowania części literaturowej pracy. Niemniej jednak Doktorant „rehabilituje się” w kolejnym podrozdziale zatytułowanym „*Scientific rationale and aims of the thesis*”, w którym uzasadnia racjonalność prowadzonych badań przedstawiając cele szczegółowe pracy. W tym miejscu zabrakło mi jasno postawionej hipotezy badawczej, mimo że została ona zdefiniowana w toku całej pracy.

W części eksperymentalnej, stanowiącej główną część pracy (64 strony), opisano wszystkie materiały i metody badawcze, które Doktorant wykorzystał w swoich badaniach, wyniki badań wraz z dyskusją i wnioskami. Doktorant szczegółowo i klarownie opisał metodykę

przewodzenia hodowli komórek stosowanych w badaniach (linie komórkowych makrofagów mysich [REDACTED] i ludzkich [REDACTED]), jak również makrofagów pochodzących z [REDACTED]), transfekcji komórek oraz przygotowania próbek ferrytyny. W badaniach zastosował m.in. takie techniki jak cytometria przepływowa (do zbadania wychwytu i transferu ferrytyny) i mikroskopia konfokalna (do wizualizacji dystrybucji ferrytyny w makrofagach i komórkach nowotworowych), mikroskopia holotomograficzna i cytometria przepływowa połączona z obrazowaniem mikroskopowym (do zwizualizowania interakcji komórka-komórka podczas transferu ferrytyny pomiędzy makrofagami i komórkami nowotworowymi), spektroskopia korelacji fluorescencji, Western Blot oraz testy MTT. Doktorant wykorzystywał również inhibitory oraz metodę wyciszenia genów [REDACTED] do identyfikacji szlaków i genów zaangażowanych w transfer ferrytyny.

Doktorant nie uchronił się w tej części od pewnych, drobnych uchybień (niektóre z nich wymienione na końcu recenzji). Dodatkowo, proszę uściślić w jaki sposób ustalono gęstość komórek [REDACTED] (5×10^4 komórek/ml) stosowaną do różnicowania komórek (str. 43). Czy było to elementem optymalizacji prowadzonej przez Doktoranta, czy gęstość została ustalona na podstawie innych prac. Czy w toku prowadzonych badań, Doktorant potwierdzał uzyskanie makrofagów [REDACTED]. Proszę również o wyjaśnienie jakie stężenie roztworu stosowano w testach toksyczności MTT (str. 54).

W ramach przeprowadzonych badań Doktorant wykazał, że pobieranie ferrytyny było najbardziej wydajne przez makrofagi. Potwierdza to ich potencjał jako nośnika koniugatu ferrytyna-lek. Dodatkowo, scharakteryzował zależność pobierania ferrytyny od stężenia i czasu przy użyciu [REDACTED], jak również makrofagów pochodzących z [REDACTED]. Bardzo proszę o uściślenie, dlaczego zastosowano 4°C oraz 37°C w badaniu ferrytyny. Pominięto również informację jakie stężenia ferrytyny stosowano w badaniach.

Warta podkreślenia jest mnogość badań wykonanych przez Doktoranta, z zastosowaniem wielu typów komórek. Doktorant w toku badań dowiódł, że ferrytyna była przekazywana z makrofagów do komórek nowotworowych we współhodowli *in vitro*. Wydajność tego procesu różniła się w zależności od badanego modelu makrofagów i typu komórek nowotworowych. Doktorant wykazał również potencjał terapeutyczny koniugatu [REDACTED] w stosunku do komórek nowotworowych współhodowanych z makrofagami. W dalszej części badań Doktorant prowadzi szereg badań mających na celu potwierdzenie hipotezy (która dopiero w tekście pracy zdefiniowana jest na stronie 92), że preferowany sposób transferu ferrytyny to bezpośredni kontakt makrofagów z komórkami nowotworowymi. [REDACTED]

[REDACTED]. Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej bez wątpienia

wnoszą istotną wiedzę, która wykorzystywana może być w pracach związanych z opracowywaniem terapii przeciwnowotworowych.

Na podkreślenie zasługuje mnogość testów jakie Doktorant wykonał z wykorzystaniem różnych typów komórek.

. Słusznie wysunięto wniosek, że wydajność transferu ferrytyny była obserwowana we wszystkich badanych modelach makrofagów i wszystkich badanych typach nowotworów. Taka różnorodność badanego materiału nie uchroniła jednak od pewnego rodzaju zamieszania w opisie przeprowadzonych badań. W mojej ocenie brakuje uporządkowania wyników jakie Doktorant uzyskał dla poszczególnych linii komórkowych, a co za tym idzie szczytkowych wniosków. W kolejnych rozdziałach pracy Doktorant opisuje badania z wykorzystaniem makrofagów mysich lub ludzkich, nie uzasadniając, dlaczego w danym typie badań zastosowano takie a nie inne linie komórkowe. Dodanie krótkich komentarzy, wniosków czy podsumowania w podrozdziałach zawierających opisywane wyniki (przykładowo: 4.2.1 (podwójnie tak samo nazwany), 4.3.2, 4.3.3., 4.3.4.) z pewnością by w tym pomogły. Bardzo proszę o (1) uściślenie uzasadnienia doboru określonych linii komórkowych w poszczególnym typie badań i (2) uporządkowanie wniosków, jakie się nasuwają dla badań wykonanych dla poszczególnych linii komórek makrofagów i nowotworowych oraz składają się na wniosek końcowy pracy.

Proszę o komentarz, czy stosowany związek miał wpływ na uzyskiwane wyniki w pomiarze cytometrii przepływowej. Na str. 106, doktorant lakonicznie pisze, że „mogą być stosowane inne leki”. Proszę wyjaśnić jakie leki miał na myśli Doktorant i czy są już prowadzone w tym kierunku badania.

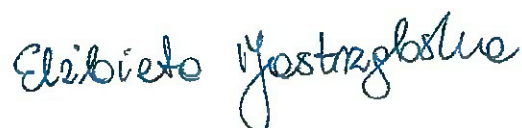
Przykładowe, inne drobne uwagi:

- *et al.* – piszemy kursywą
- *in vitro* piszemy kursywą
- Fig. 5 str. 26 – Brakuje opisu poszczególnych elementów schematu. Wyjaśnienie co oznacza dany element z pewnością uczyniłoby Rysunek bardziej czytelny.
- Doktorant bardzo często stosuje akapity zbudowane wyłącznie z jednego lub dwóch zdań.
- Literówka „uman” zamiast „human”
- Str. 24 – w opisie literatury (L. Zhang *et al.* 2020) nie powinno być inicjału imienia.
- str. 45 jednostka „M -1 cm -1”
- str. 57 – Fig. 17 co oznaczają poszczególne kolory na wykresie?
- Fig. 22 – Czy robiona była analiza statystyczna dla przeprowadzonych badań?
- Str 85 – powinno być „calcein-AM” zamiast „calcein”
- Str. 86 – Fig. 45 Brakuje zdjęć dla kontroli.
- Błąd w spisie tabel i zdjęć
- Fig. 29 oraz Fig. 31 – dlaczego wyniki przedstawiono tylko dla dwóch eksperymentów?

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Macieja Białaska stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 roku poz. 742). Zgodnie z zapisem Ustawy Art. 187. Pkt 1. "Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej" oraz pkt. 2. "Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne." Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie i wykorzystanie przez Doktoranta szerokiego zakresu nowoczesnych metod badawczych, a także opanowanie umiejętności opracowania i prezentacji wyników oraz znajomość najnowszych prac i danych literatury światowej dotyczących problematyki podjętej w pracy doktorskiej. Doktorant nie umieścił swoich danych bibliograficznych w rozprawie doktorskiej. Niemniej jednak wg Bazy Scopus Autor jest współautorem 9 prac, ze współczynnikiem oddziaływania wynoszącym $h=7$. W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Macieja Białaska do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom merytoryczny badań, a także dorobek naukowy Doktoranta pragnę rekomendować niniejszą rozprawę do wyróżnienia.

Recenzent



Dr hab. inż., prof. uczelni Elżbieta Jastrzębska

Zawieszona
Chemicznych i Biologii
DZIAŁ CHEMICZNY
skiego 3, 00-864 Warszawa
234-75-07, tel/fax (0-22) 622-27-41

R
(00)359007734106649475

(00)359007734106649475
Poczta Polska
Opłata pocztowa _____ zł _____ BI

POTWIERDZENIE
ODBIORU

POLECONY

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2023 -09- 20
WPKYNEŁO DNIA -5-



Instytut Biologii SGGW
w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02 - 776 Warszawa
do P. Prof. Agnieszki Gnielzodowskiej - Piekorskiej

70