



Pracownia Multiomiki Chorób Człowieka
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk
ul. A. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa



Warszawa 01.09.2021

RECENZJA RZOPRAWY DOKTORSKIEJ MGR AGATY BRANIEWSKIEJ
pt. „Zbadanie pobierania hemoglobiny przez makrofagi i jej przekazywania komórkom
nowotworowym”

Rozprawa doktorska pani mgr Braniewskiej jest wartościowym zbiorem informacji i wyników badawczych na temat transferu białka hemoglobiny z ludzkich makrofagów do innych komórek, w tym komórek nowotworowych. Badanie tego procesu może pozwolić na wykorzystanie go jako sposobu przenoszenia substancji (w tym leków) do komórek docelowych.

Rozprawę rozpoczyna klarowny, bogaty ilustracje wstęp teoretyczny, pozwalający zrozumieć podstawy i dotychczasowe dane opublikowane na temat roli makrofagów, struktury i funkcji hemoglobiny oraz ich powiązania – wydajnej internalizacji hemoglobiny przez makrofagi, a następnie przekazywania jej do komórek, z którymi makrofagi wchodzi w interakcje. Z tym wiąże się jedno z ważniejszych pytań pracy doktorskiej – jaki jest mechanizm przekazywania hemoglobiny z makrofagów do innych komórek? Dobre wprowadzenie do wyników przedstawionych dalej w tym zagadnieniu stanowi podsumowanie we wstępie rozprawy rodzajów połączeń międzykomórkowych, które mogą odgrywać rolę w przekazywaniu hemoglobiny.

Wyniki doświadczalne przedstawione są w jasnych i łatwych do prześledzenia rozdziałach. Potwierdzone są podstawy – wydajne pobieranie hemoglobiny przez monocyty, a nie inne komórki jednojądrzaste krwi, oraz ustawione zostają parametry skutecznego monitorowania pobierania hemoglobiny przez makrofagi. Następnie, ustawionymi metodami, opisanymi dokładnie w oddzielnym rozdziale rozprawy, sprawdzone jest przekazywanie hemoglobiny z makrofagów do innych makrofagów oraz do komórek nowotworowych linii raka piersi i jajnika. Po potwierdzeniu tychże następuje najbardziej bogata w szczegółowe doświadczenia część pracy – badanie mechanizmu przekazywania hemoglobiny z makrofagów do komórek docelowych. Zbadany tu został szereg potencjalnych mechanizmów międzykomórkowego transferu hemoglobiny – co

zakończyło się stwierdzeniem, iż transport hemoglobiny odbywa się przede wszystkim przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

Całość zamknięta jest dyskusją, pozwalającą umiejscowić przedstawione wyniki jako znacznie poszerzające wiedzę w transferze hemoglobiny z makrofagów do innych komórek – w tym przypadku nowotworowych. Wspomniane są też wstępne wyniki własne potwierdzające możliwość wykorzystania hemoglobiny jako nośnika leków antynowotworowych.

Rozprawa stanowi bogaty, logiczny zbiór doświadczeń, prowadzący do spójnych konkluzji, co potwierdza bardzo dobry poziom naukowy doktorantki. Dla mnie wyjątkowo cenna była zwięzłość i klarowność przedstawionych wyników – praca nie jest przegadana, brak jest niepotrzebnych dygresji i szczegółów – co pozwala skupić się na meritum. To bardzo ważna cecha opisywania nawet najbardziej skomplikowanych tematów i badań we współczesnej nauce – aby mogli się nimi zainteresować ludzie spoza ścisłego grona specjalistów w omawianym obszarze wiedzy. Udało się to osiągnąć ze znakomitą efektem.

Poza kilkoma dodatkowymi pytaniami merytorycznymi (na końcu) mam jeden drobny komentarz krytyczny. Dotyczy on niekonsekwencji w przedstawianiu wyników przede wszystkim na wykresach słupkowych i stosowaniu kontroli w doświadczeniach. Na niektórych wykresach, np. Ryc. 12, 18, 22 czy nawet 43, nie jest przedstawiona znamienność statystyczna, a w opisie ryciny brakuje przeprowadzonego testu statystycznego. W części przypadków (np. ryc. 43) różnice są bardzo duże, niemal jakościowe, co może uzasadniać brak testu, ale w innych – np. ryc. 22, już nie. W kolejnych rycinach, zawierających analogiczne – bardzo duże lub mniejsze różnice pomiędzy średnimi – np. Ryc. 27, 28 czy 32 – są podane przedziały znamienności statystycznej i opisany jest zastosowany test statystyczny. Chodzi zatem o niekonsekwencję – gdy wprowadzony jest standard testowania, warto go utrzymać przez cały przebieg pracy. Takie są też wymagania dobrych czasopism naukowych. Czasem test może wydawać się niepotrzebny, ponieważ w przedstawionym doświadczeniu nie ma kontroli negatywnej – np. w rycinie 18 czy 20. Ale taka kontrola, praktycznie na poziomie tła odczytu, pojawia się jednak np. na rycinie 24. Zatem ponownie – jest niekonsekwencja w stosowaniu lub/i przedstawianiu doświadczeń kontrolnych.

Nie są to jednak problemy, które znacząco wpływają na ogólny poziom wyników (najważniejsze są opatrzone testami statystycznymi i odpowiednimi kontrolami), naukowych wniosków rozprawy, ani na mój ogólnie bardzo dobry jej odbiór. Praca jako całość zasługuje na wysoką ocenę i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych o dopuszczenie mgr Agaty Braniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowe pytania naukowe na obronę (podyktowane ciekawością, nie krytyką):

1. W wielu doświadczeniach w pracy wykorzystano hemoglobinę koniugowaną z barwnikami fluorescencyjnymi z grupy Alexa Fluor. Czy zostało, jako kontrola, sprawdzone jak same te barwniki mogą być pobierane przez makrofagi i przekazywane do komórek nowotworowych? Czy obecność oddzielonego od hemoglobiny barwnika fluorescencyjnego mogła mieć wpływ na wyniki przeprowadzonych doświadczeń?
2. Czy w przeprowadzonej w pracy analizie hemoglobiny w cytoplazmie komórek nowotworowych przy użyciu spektroskopii korelacji fluorescencji można obliczyć lub sprawdzić doświadczalnie współczynnik dyfuzji dla samego barwnika AF568 w badanych komórkach? Czy to pozwoliłoby na odróżnienie hemoglobiny związanej z AF568 od samego barwnika, który też potencjalnie może znaleźć się w komórkach, np. po ewentualnym odłączeniu od hemoglobiny?
3. Na ile specyficzny jest badany transport hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych? Czy badane były jako biorcy komórki nietransformowane – np. ludzkie fibroblasty – i porównane z komórkami nowotworowymi? Jeśli do komórek normalnych może być także wydajnie przekazywana hemoglobina – jak zapewnić specyficzny dla nowotworów transfer leków ew. przyłączonych do hemoglobiny?
4. Czy istnieją mechanizmy rozpoznawania przez makrofagi specyficznie komórek nowotworowych czy mikrośrodowiska guza nowotworowego? Czy można je wykorzystać (także przez manipulację nimi) w doświadczeniach *in vivo* w nakierowaniu tych komórek specyficznie na nowotwór i ew. użycia mechanizmu transferu hemoglobiny do walki z nowotworem?

Z gratulacjami i wyrazami szacunku



IMDiK PAN
Pracownia Multi-omiki Chorób Człowieka
02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5

[Faint signature]