



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytoologii
dr hab. Iwona Grabowska-Kowalik



Warszawa, 07.10.2021

**Rada Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Braniewskiej
pt. „Zbadanie pobierania hemoglobiny przez makrofagi
i jej przekazywania komórkom nowotworowym”.**

Praca doktorska Pani mgr Agaty Braniewskiej powstała w Zakładzie Immunologii Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy był dr. hab. n.med. Tomasz Rygiel. Praca ma formę klasycznej rozprawy, na którą składają się główne części: 1) Wstęp, 2) Założenia i cele pracy, 3) Materiały i metody, 4) Wyniki, 5) Dyskusja oraz 6) Wnioski. Rozprawa zawiera także streszczenia w języku polskim i angielskim a także wykazy skrótów, tabel, rycin i bibliografię.

Badania realizowane przez Panią Braniewską były finansowane z projektu Team-Tech Fundacji na rzecz Nauki Polskiej pt. „Przełomowy, komórkowy system dostarczania leków do guza” kierowanego przez Promotora pracy. W rozprawie zabrakło informacji o współautorstwie Pani mgr Braniewskiej w powstałych w wyniku realizacji badań do pracy publikacjach, plakatach i prezentacjach na konferencjach naukowych, manuskryptach czy też zgłoszeniach patentowych.

1. Wartość naukowa rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Braniewskiej dotyczy analizy nowego, zaobserwowanego przez zespół dr. Tomasza Rygla, procesu polegającego na transferze hemoglobiny z makrofagów do innych komórek. Mechanizm ten być może zostanie wykorzystany w przyszłości do zastosowania w komórkowej terapii przeciwnowotworowej. Taka terapia mogłaby opierać się o dostarczanie leków

przeciwnowotworowych i przekazywanie ich przez makrofagi, które wychwyciły wcześniej skoniugowane z hemoglobina terapeutyki. Może to mieć duże znaczenie w ograniczaniu efektów ubocznych leków przeciwnowotworowych działających ogólnoustrojowo a także możliwość dostarczenia ich do mniej ukrwionych tkanek. W świetle liczby corocznie wykrywanych przypadków nowotworów podjęcie takiego tematu uważam za bardzo ważne z medycznego i społecznego punktu widzenia. Chciałabym też podkreślić, iż kluczowe dla wynalezienia skutecznych terapii przeciwnowotworowych jest innowacyjne podejście do badań nawet tych przedklinicznych, a za takie uważam podjęte przez Panią mgr Braniewską analizy.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Doktorantka we *Wstępie* podejmuje wszystkie konieczne dla zrozumienia pracy tematy. Rozpoczyna od zwięzłego opracowania stanu wiedzy na temat makrofagów – populacji, charakterystyki i funkcji. Następnie omawia budowę, funkcje i właściwości hemoglobiny i przechodzi do opisu roli makrofagów w metabolizmie hemoglobiny. Makrofagi pełnią rolę zarówno w syntezie jak i degradacji hemoglobiny. Kluczowe mechanizmy metabolizmu hemoglobiny to erytrofagocytoza i degradacja z udziałem receptora CD163. Ekspresja CD163 w makrofagach rośnie po stymulacji czynnikami prozapalnymi. W kolejnych podrozdziałach *Wstępu* do pracy przybliża tematy związane z mechanizmami transportu międzykomórkowego takimi jak: połączenia szczelinowe – dynamiczne struktury zbudowane z koneksyn; tunelujące nanorurki – wypustki/kanaly międzykomórkowe zawierające aktynę; i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, które opisuje najobszerniej, jako markery różnych schorzeń, potencjalny cel terapeutyczny lub nośnik służący do dostarczania leków do uszkodzonych tkanek. W mojej opinii *Wstęp* do pracy wyczerpująco przedstawia kontekst badań prowadzonych przez Doktorantkę, a jednocześnie nie jest przesadnie szczegółowy. Chciałabym poznać opinię Doktorantki na temat realnego potencjału terapeutycznego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

W kolejnej części rozprawy *Założenia i cele pracy* Doktorantka bardzo zwięźle opisuje jakie były podstawy naukowe podjęcia takiego tematu badań. Hemoglobina występuje w krwinkach czerwonych i bierze udział w transporcie gazów oddechowych. Dotychczas uważano, że makrofagi pełnią istotną rolę w metabolizmie hemoglobiny poprzez erytrofagocytozę lub usuwanie wolnej hemoglobiny poprzez wiązanie z haptoglobina a później receptorem CD163. Zaobserwowany *in vitro* przez badaczy z zespołu dr. hab. Tomasza Rygla proces przekazywania hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych stanowił podstawę do przeprowadzenia szeregu analiz, których podjęła się Pani mgr Braniewska. Doktorantka postawiła sobie za cel: 1) zbadanie

pobierania hemoglobiny przez makrofagi; 2) weryfikację procesu przekazywania hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych 3) sprawdzenie przekazywania hemoglobiny między makrofagami; 4) scharakteryzowania procesu przekazywania hemoglobiny i 5) zbadanie mechanizmu przekazywania hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych. Niestety Doktorantka nie sformułowała hipotezy badawczej, choć można się jej domyśleć ze wstępu do rozdziału *Założenia i cele pracy*. Brakuje też danych z obserwacji, które stały się podstawą do podjęcia omawianych badań.

Materiały i metody stosowane w pracy zostały opisane szczegółowo, co jest niezaprzeczalną wartością rozprawy. Doktorantka omawia drobiazgowo wszystkie metody i wprowadza szczegóły techniczne, które umożliwiają odtworzenie przeprowadzonych badań. Do realizacji założonych celów zastosowała szeroki wachlarz dobrze dobranych analiz cytochemicznych i molekularnych. Wiele materiałów lub warunków prowadzenia doświadczenia, takich jak np. związki wykorzystywane do prowadzenia hodowli mieszanych, koniugacja białek z barwnikami fluorescencyjnymi, warunki przeprowadzenia qPCR, została przedstawiona w postaci czytelnych tabel ułatwiających odnalezienie potrzebnych informacji. Chciałabym się dowiedzieć dlaczego Doktorantka podczas cytochemicznego barwienia komórek do obrazowania w mikroskopie konfokalnym stosowała do permeabilizacji komórek saponinę i żelatynę a nie standardowo używany w tak prostej procedurze Triton X100? W tej części rozprawy powinien również znaleźć się wyraźny opis układów doświadczalnych, które zostały wykorzystane, czyli komórek mysich i ludzkich. Mam zastrzeżenia do podrozdziału *Analiza statystyczna oraz opracowanie graficzne*, w którym Doktorantka stwierdza, że brak istotności statystycznej oznaczano „ns” w czym nie ma konsekwencji w późniejszym przedstawianiu uzyskanych wyników. Nie określono również w jaki sposób dobierano liczebność badanych grup. Wydaje mi się, że już w tej części pracy powinna znaleźć się informacja, że w wielu przypadkach analizowano tylko dwa powtórzenia.

Wyniki zostały przedstawione w logicznym ciągu i w zrozumiały sposób. Punktem wyjścia było potwierdzenie zdolności do pobierania hemoglobiny przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej i makrofagi ludzkie i mysie. Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, mikroskopii konfokalnej i techniki Western blot wykazały, że makrofagi pobierają hemoglobinę z pożywki. Ponadto Doktorantka wykazała, że pobieranie hemoglobiny przez makrofagi może być niezależne od haptoglobiny i receptora CD163, a także że ilość pobranej hemoglobiny jest skorelowana z wydłużaniem czasu inkubacji ze znakowaną hemoglobiną. W kolejnym etapie badań analizowano przekazywanie hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych w

hodowlach mieszanych, w których komórki miały ze sobą bezpośredni kontakt. Do przeprowadzenia tych doświadczeń Doktorantka wykorzystała wiele linii komórek nowotworowych ludzkich i mysich. Wykazała, że transfer hemoglobiny zachodzi we wszystkich układach badawczych i jest to proces skorelowany z czasem i ilością hemoglobiny podanej wcześniej makrofagom. Wydaje mi się, że ciekawe byłoby skomentowanie wyraźnie niższej wydajności przekazywania hemoglobiny z mysich makrofagów pochodzenia szpikowego (BMDM) do komórek nowotworowych (Ryc. 20C). Doktorantka wykorzystała również spektroskopię korelacji fluorescencji aby lepiej scharakteryzować proces przekazywania hemoglobiny. Wykazała również, że dochodzi do transferu hemoglobiny pomiędzy makrofagami. W części wyników dotyczącej przekazywania hemoglobiny przez makrofagi do komórek nowotworowych rzuca się w oczy brak w układach doświadczalnych komórek kontrolnych/nienowotworowych (np. ludzkie/mysie fibroblasty lub HUVEC). Czy brak takiej kontroli jest w jakiś sposób uzasadniony? Mam też pytanie dlaczego Doktorantka nie wykorzystywała całego spektrum dostępnych linii i w różnych doświadczeniach stosowano różne linie komórkowe? Istotne jest też dlaczego w wielu przypadkach (np. Ryc. 16, 18, 20) doświadczenia prowadzono w małej liczbie powtórzeń, gdzie $n=2$.

Kolejna część *Wyników* dotyczy określenia mechanizmu przekazywania hemoglobiny do komórek nowotworowych. W pierwszym etapie tej części badań Doktorantka wykazała, że przekazywanie hemoglobiny do komórek nowotworowych jest wydajne wtedy, kiedy komórki mają ze sobą bezpośredni kontakt a zahamowanie wewnątrzkomórkowego transportu białek i blokowanie polimeryzacji aktyny i tubuliny ma istotny negatywny wpływ na przekazywanie hemoglobiny. Następnie po wykonaniu serii doświadczeń Doktorantka wykluczyła rolę tunelujących nanorurek w przekazywaniu hemoglobiny z makrofagów do komórek nowotworowych i przeszła do badań nad rolą pęcherzyków w transferze hemoglobiny. Uzyskała dane potwierdzające, że komórki nowotworowe pobierają hemoglobinę z kondycjonowanej przez makrofagi pożywki. Tu znów nasuwa się pytanie dlaczego to kluczowe dla wniosków doświadczenie (Ryc. 43) zostało wykonane tylko na dwóch liniach nowotworowych. Wydaje się, że więcej miejsca powinno być poświęcone na badania w układzie z zastosowaniem szalek z membranami o różnej średnicy porów, tak by potwierdzić zdolność komórek nowotworowych do pobierania hemoglobiny wydzielanej przez makrofagi w pęcherzykach do środowiska zewnętrznego.

Za bardzo wartościowy element rozprawy Pani Braniewskiej uważam sposób przedstawienia wyników, klarowne wykresy i świetne ryciny dokumentujące analizy w mikroskopie konfokalnym.

Dyskusja stanowi bardzo dobrą krytyczną analizę uzyskanych wyników. Doktorantka podejmuje wszystkie ważne wątki i pytania, które nasuwają się podczas analizy rozdziału *Wyniki*. Interpretuje uzyskane dane na tle literatury przedmiotu i nie boi się zmierzyć z trudnymi w ocenie wynikami jak np. określenie roli cytoszkieletu w procesie przekazywania hemoglobiny. Sposób prowadzenia tej części rozprawy świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i chyba jedyne czego zabrakło, to bardziej krytycznego podejścia do zastosowanych metod. Chciałabym, aby Doktorantka wyraziła swoją opinię o potencjalnych zagrożeniach zastosowania terapii z wykorzystaniem makrofagów przekazujących hemoglobinę połączoną z lekiem przeciwnowotworowym.

W kolejnej części pracy Doktorantka sformułowała 5 niebudzących zastrzeżeń Wniosków.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Układ pracy jest prawidłowy i typowy dla rozprawy doktorskiej. Recenzowana rozprawa liczy 104 strony i jest starannie zredagowana i napisana poprawnie. W tekście zdarzają się niezręczności językowe jak np. „makrofagi różnicowane z...” str. 12, „załadowany do makrofagów” str. 82, czy „podano komórkom nowotworowym” str. 78.. Nie mogę się również zgodzić na „tkankę mózgową” str. 92, która nie jest znana histologom. Bardzo rzadko zdarzają się anglicyzmy takie jak np. „medium” zamiast „pożywka”, czy „przeciwciała anty-...” zamiast „przeciwciała skierowane przeciwko...”. Autorka nie ustrzegła się też wielu literówek

4. Ocena końcowa

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że moje krytyczne uwagi nie wpływają na wysoką ocenę merytorycznej strony pracy. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Agaty Braniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

07.10.2021

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta