

Wrocław 08.04.2023
Prof. dr hab. inż. Marek Langner
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Politechnika Wrocławska
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-270 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Małgorzaty Kubiak

pt. „Badanie mechanizmu pobierania H-ferrytyny przez ludzkie makrofagi”

napisanej pod kierunkiem prof. Magdaleny Król

1. OPINIA OGÓLNA

Wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej przygotowanej przez mgr. Małgorzatę Kubiak zarówno pod względem merytorycznym jak i zastosowanego warsztatu badawczego pokazują dobrą znajomość analizowanych zagadnień oraz umiejętność formułowania hipotez, planowania doświadczeń oraz wyciągania wniosków z uzyskanych wyników badań doświadczalnych. Na uwagę zasługuje ostrożność z jaką badaczka formułuje wnioski co świadczy o dużej pokorze połączonej ze świadomością, że w złożonych doświadczeniach proponowane wnioski bardzo zależą od przyjętego modelu koncepcyjnego w fazie projektowania badań. W swojej pracy autorka podejmuje trudne zagadnienia związane z rolą makrofagów w homeostazie żelaza a w szczególności dotyczące eliminacji ferrytyny z płynów fizjologicznych. Badania te prowadzone są w kontekście możliwości wykorzystania ferrytyny jako nośnika dla substancji czynnych farmakologicznie. Autorka rozprawy wskazuje, że w celu uzyskania specyficzności tkankowej czy nawet komórkowej można wykorzystać makrofagi. Szczegółowe cele badawcze wskazane w rozprawie dotyczą poznania mechanizmów pobierania ferrytyny przez makrofagi oraz identyfikacja odpowiedzialnych receptorów błonowych. Prezentowane wyniki pokazują, że cele te zostały osiągnięte, a pozyskana w wyniku prowadzonych prac wiedza jest istotnym wkładem do szerszego zagadnienia związanego z opracowaniem strategii farmakologicznej opartej na wykorzystaniu makrofagów jako dystrybutora związanej z ferrytyną substancji farmakologicznie czynnej. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest bardzo interesująca a przedstawione w niej wyniki, są znacznym przyczynkiem do zrozumienia mechanizmów związanych z rolą makrofagów w dystrybucji ferrytyny, która jest istotna zarówno z fizjologicznego jak i farmakologicznego punktu widzenia.

2. OCENA MERYTORYCZNA

2.1. Znaczenie podjętej problematyki

Makrofagi są nie tylko ważnym składnikiem układu immunologicznego, ale także kluczowym elementem redystrybucji masy w organizmie. Ta druga funkcja makrofagów jest przedmiotem zainteresowania mgr Kubiak a w szczególności ich rola w redystrybucji potencjalnie groźnego dla organizmu żelaza. Makrofagi są między innymi odpowiedzialne za odzysk żelaza z erytrocytów i przekierowanie go do szpiku kostnego w kompleksie z transferyną. Makrofagi posiadają naturalną zdolność do oddziaływania ze wszystkimi elementami homeostazy żelaza w tym z ferrytyną, cytoplazmatycznym białkiem odpowiedzialnym za magazynowanie żelaza w formie nieszkodliwej dla struktur komórkowych. Wyniki badań zaprezentowane w rozprawie są elementem szerszego utylitarnego projektu jakim jest wykorzystanie makrofagów w celu selektywnego dostarczania substancji czynnych farmakologicznie do nowotworów. Dodatkowo, substancje te związane są z ferrytyną i znajdując się we wnętrzu makrofagów mogą okazać się niegroźne dla samych makrofagów jak też dla komórek postronnych. Wykorzystanie takiego sposobu dostarczania substancji farmakologicznie czynnych w farmakoterapii przeciwnowotworowej wymaga poznania mechanizmów odpowiedzialnych za wchłanianie ferrytyny przez makrofagi. Rozprawa doktorska dotyczy właśnie tego zagadnienia, a w szczególności tego w jaki sposób ferrytyna pokonują barierą błony plazmatycznej. Pokazanie jakie receptory wiążą ferrytynę oraz jak po związaniu wnika ona do cytoplazmy jest ważnym osiągnięciem, istotnym nie tylko z punktu widzenia potencjalnych zastosowań farmakologicznych, ale także jako element pozwalający zrozumieć molekularne podstawy fizjologii makrofagów. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

2.2. Struktura rozprawy

Rozprawa mgr. Małgorzaty Kubiak liczy 155 stron. Rozprawa napisana jest w sposób, który pokazuje, że autorka potrafi opisać prezentowane zagadnienia w sposób precyzyjny. Praca napisana jest zgodnie z powszechnie przyjętym schematem. Składa się z abstraktu (dwie strony), spisu treści, wstępu (21 stron), celu pracy, materiałów i metod (24 strony), wyników (50 stron), dyskusji (7 stron), jednej strony podsumowania oraz listy 225 cytowanych publikacji. W pracy znalazły się także, bardzo przydatne, choć niekompletne, zestawienie używanych skrótów oraz lista tabel i wykresów.

We wstępie autorka prezentuje kontekst prowadzonych badań oraz przedstawia stan wiedzy dotyczącej makrofagów, środowiska tkanki nowotworowej oraz ferrytyny. Następnie przedstawia mechanizmy transportu pęcherzykowego oraz receptory oczyszczające (ang. scavenging receptors). Wstęp napisany jest bardzo poprawnie chociaż miejscami dosyć skąpo. Myślę, że we wstępie można było zawrzeć dane ilościowe, które mogą być istotne z punktu widzenia kierowanego dostarczania substancji farmakologicznie czynnych. Dotyczy to w szczególności rozmiaru ferrytyny czy wielkości związanych z poszczególnymi szlakami transportu pęcherzykowego. Brakuje mi także wizualizacji ferrytyny. Uważam, że graficzne przedstawienie obiektu badań znacznie ułatwiłoby czytanie oraz zobrazowanie opisywanych procesów.

Rozdział Materiały i Metody napisane są zgodnie z obowiązującymi zasadami i zawierają wszystkie niezbędne informacje dotyczące stosowanych technik doświadczalnych oraz procedur związanych z przygotowaniem materiału badawczego. Przedstawione zestawienie narzędzi badawczych pokazuje, że autorka bardzo umiejętnie korzystała z gotowych do użycia procedur i metod preparatywnych, co pozwoliło jej na zastosowanie dużej liczby technik bez wnikania w szczegóły techniczne, co czasami może okazać się zdradliwe. Podejście takie umożliwiło jej skupienie się na planowaniu doświadczeń i analizowaniu uzyskanych wyników. Zastosowanie prezentacji graficznej bardziej złożonych procedur jest dobrym pomysłem chociaż w przypadku elektroporacji czy pomiarów kinetycznych pokazanie samych urządzeń nie jest wystarczające.

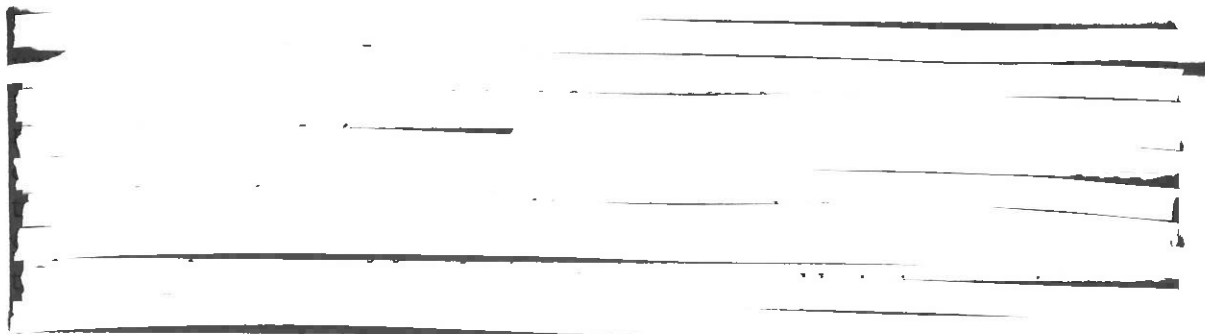
Wyniki zaprezentowane są w logiczny sposób, a kolejność ich prezentacji pozwala na łatwe śledzenie toku rozumowania wiodącego do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Uzyskane dane doświadczalne prezentowane są w taki sposób, że można sobie wyrobić opinie na temat jednoznaczności obserwowanych zmian. Autorka uzyskała ten efekt poprzez pokazanie danych rzeczywistych wraz z zestawieniami wyników w formie wykresów.

Dyskusja, choć niezbyt obszerna w sposób zadowalający omawia uzyskane wyniki w kontekście dostępnych danych w zakresie biologii molekularnej i fizjologii komórki. Krótkie podsumowanie zwięźle przedstawia główne wnioski uzyskane w wyniku prowadzonych badań.

2.3. Metodyka badawcza

Autorka wykorzystuje bardzo bogaty zestaw technik doświadczalnych w zakresie biologii molekularnej w tym hodowli komórkowych, narzędzi inżynierii genetycznej takich jak transfekcja komórek czy hamowanie ekspresji białek z wykorzystaniem siRNA. Techniki te wymagają umiejętności korzystania z często złożonej infrastruktury technicznej, np. mikroskopu konfokalnego czy elektroporacji. W pracy wykorzystano także metody biochemiczne nakierowane na określenie molekularnego oddziaływania ferrytyny z badanymi receptorami. W badaniach tych wykorzystano biointerferometrię, termoforezę mikroskalową oraz pomiar wiązania z wykorzystaniem analizy przesunięcia widmowego. Zastosowanie takich metody pokazuje, że autorka potrafi stosować nowe techniki pomiarowe. Uważam, że umiejętność wyboru i właściwego zastosowania różnorodnych technik badawczych świadczy o dużym doświadczeniu mgr. Kubiak jako eksperymentatora.

2.4. Wyniki



[REDAKCYJNE WYKREŚLENIE]

Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu wnikania ferrytyny do limfocytów co jest znaczącym osiągnięciem. Dzkoda, że nie podjęto próby oceny ilościowej tego procesu.

2.5. Język i formalna strona rozprawy

Praca napisana jest w bardzo poprawną angielszczyznę. Prezentowane zagadnienia opisane są precyzyjnie z wykorzystaniem bogatego słownictwa. Wykresy są przygotowane starannie a towarzyszące im dane rzeczywiste dobrze ilustrują mierzone zależności. Z formalnego punktu widzenia praca spełnia wszystkie wymogi zwyczajowo stawiane rozprawom doktorskim. Literatura wykorzystania do zilustrowania przedstawionych zagadnień jest dobrana w taki sposób, że wszystkie ważne dla pracy tezy i opisy są wsparte stosownymi materiałami źródłowymi.

2.6. Dodatkowe zapytania i uwagi

1) Będę niezmiernie wdzięczny za zaprezentowanie strategii zastosowania makrofagów do przenoszenia substancji farmakologicznie czynnej związanej z ferrytyną? Czy technika ta dotyczy każdej substancji farmakologicznie czynnej? Jeżeli docelowy preparat będzie podawany systemowo to w jaki sposób uzyskana będzie specyficzność tkankowa?

2) Badania przeprowadzono z wykorzystaniem HfT. Czy można uzyskane w ten sposób wyniki wykorzystać do opisu wchłaniania całego agregatu ferrytyny?

[REDAKCYJNE WYKREŚLENIE]

3. Wniosek

Przedstawione w recenzji uwagi i zapytania w żaden sposób nie zmieniają mojej generalnie pozytywnej oceny przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. W mojej opinii rozprawa doktorska spełnia wymogi ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm.) tj.:

- stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest określenie mechanizmów wnikania ferrytyny do makrofagów,
- wykazuje, że mgr. Kubiak posiada szeroką wiedzę w dyscyplinie nauk biologicznych,
- potwierdza umiejętność mgr. Kubiak do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- ważność i aktualność podjętego tematu,
- przejrzystość pracy oraz spójny wywód naukowy,
- solidne ramy metodologiczne, w tym właściwy dobór metod badawczych,
- przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych na poziomie nie odbiegającym od standardów światowych,
- umiejętności formułowania samodzielnych wniosków.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Małgorzaty Kubiak pt. „**Badanie mechanizmu pobierania H-ferrytyny przez ludzkie makrofagi**” spełnia wszystkie wymogi zapisane w w/w ustawie i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.



prof. dr hab. inż. Marek Langner