

Poznań, 14.11.2025

Recenzja

rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Anety Magiery

pt. *Badanie internalizacji cząsteczek chemicznych i biologicznych
do wnętrza żywych komórek*

zrealizowana pod opieką

prof. dr hab. Roberta Hołysta oraz dr inż. Kariny Kwapiszewskiej
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

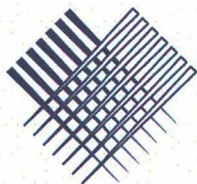
1. Ocena trafności tematu i celu rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anety Magiery została przygotowana w ramach Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej rozprawie zostały dofinansowane z projektu LIDER/10/0033/L-9/17/NCBR/2018 (NCBiR) kierowanego przez promotora pomocniczego, dr inż. Karinę Kwapiszewską.

Doktorantka jest współautorką czternastu wysoko punktowanych publikacji naukowych o wysokim wskaźniku wpływu i zasięgu międzynarodowym. Sześć z nich zostało wskazanych, jako powiązane z rozprawą doktorską, a trzy stanowią publikacje pierwszoautorskie. Dodatkowo dwie wymienionych prace zostały wyróżnione okładkami czasopism *Journal of Colloid and Interface Science* oraz *Analyst*. Doktorantka ma w swoim dorobku również patent, choć w zestawieniu dorobku, nie wskazano jego pełnego numeru, tj. PL 242705 B1. *Dorobek naukowy mgr inż. A. Magiery świadczy o jej wysokich kompetencjach badawczych i imponującym zaangażowaniu naukowym.*

Rozprawa doktorska dotyczy badań nad mechanizmami internalizacji wybranych leków, nukleotydów oraz wyznakowanych białek do wnętrza komórek, co wpisuje się w aktualne trendy badań w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne i stanowi wysoką wartość poznawczą.

Praca koncentruje się na tematyce nowotworów, w tym potrójnie ujemnego raka piersi i raka szyjki macicy, oraz sposobów ich efektywnego leczenia. Problematyka obu tych nowotworów wciąż stanowi poważne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne, wymagające dalszych intensywnych badań. Dane statystyczne wskazują, że wśród nowotworów złośliwych



występujących u kobiet, rak piersi zajmuje czołowe miejsce pod względem częstości zachorowań. Jego potrójnie ujemny podtyp (TNBC) stanowi około 10–15% przypadków i cechuje się wyjątkowo agresywnym przebiegiem. Rak szyjki macicy również pozostaje jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów kobiecych, zwłaszcza w populacjach o ograniczonym dostępie do badań profilaktycznych.

Zrozumienie mechanizmów internalizacji jest kluczowe do opracowania skutecznej terapii celowanej, i pozwoli na określenie potencjału terapeutycznego badanej substancji już na etapie badań podstawowych.

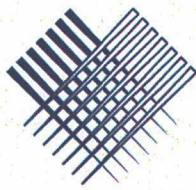
Temat rozprawy jest aktualny, naukowo uzasadniony i dobrze osadzony w światowej literaturze przedmiotu. Doktorantka przeprowadziła bardzo interesującą dyskusję, a wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały w znaczącej większości opublikowane w prestiżowych czasopismach. Ponadto, jednym z efektów jest zgłoszenie patentowe, które wskazuje na aplikacyjny charakter realizowanego projektu.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Zakres pracy obejmował szereg badań eksperymentalnych, a także analiz teoretycznych i obliczeniowych, pozwalających na zrozumienie mechanizmów wnikania wybranych modelowych cząsteczek do wnętrza komórki, przy wykorzystaniu techniki FCS wspomaganej mikroskopią konfokalną oraz FLIM i metody wnikania opartej na szoku osmotycznym. Praca ma przejrzystą i uporządkowaną strukturę.

W rozdziale 1, omówiono przykłady celowanych metod leczenia nowotworów piersi i raka szyjki macicy, m.in. opartych na przeciwciałach anti-Trop, inhibitorach VEGF czy EGFR. Autorka podjęła również dyskusję na temat potrzeby weryfikacji i zrozumienia mechanizmów internalizacji terapeutyków na etapie badań laboratoryjnych, z uwagi na różne umiejscowienie celu molekularnego komórek nowotworowych, jak i samą strategię leczenia. Zaprezentowała metody badawcze stosowane do badań nad internalizacją, m.in. mikroskopię konfokalną, obrazowanie fluorescencyjne, spektroskopię Ramana, cytometrię przepływową i wskazała technikę FCS (Spektroskopia Korelacji Fluorescencji), jako kluczową w badaniach nad wnikaniem cząsteczek do komórek. W rozdziale omówiono również metody dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek, w tym technikę szoku osmotycznego.

Na końcu znajdujemy podsumowanie wskazujące na istotę problemu, a więc choroby nowotworowe oraz zalety techniki FCS w badaniach nad wnikaniem cząsteczek, takich jak leki, białka czy dinukleotydy do komórek nowotworowych.



Rozdział 1 jest logicznie skonstruowany i uporządkowany, niemniej jednak cel pracy nie został w nim wyraźnie określony. Choć można go wywnioskować ze wstępu i dyskusji wyników, brakuje jego bezpośredniego przedstawienia wraz z celami szczegółowymi.

W rozdziale 2, zaprezentowano metodykę badawczą, uwzględniając odczynniki wykorzystane do przeprowadzenia eksperymentów, wybrane linie komórkowe, szczegółowe opisy aparatury oraz metodykę prowadzenia pomiarów i sposoby analizy wyników. *Autorka zastosowała zestaw nowoczesnych metod badawczych odpowiednio dobranych do badań internalizacji komórek, w tym mikroskopię konfokalną, obrazowanie FLIM i pomiary FCS. Wszystkie metody zostały dobrane adekwatnie do założonych hipotez badawczych.*

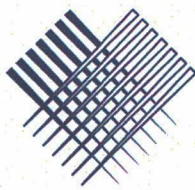
Rozdział 3, poświęcony omówieniu wyników, zawiera obszerną dyskusję dotyczącą wnikania olaparibu, bewacyzumabu, terapeutycznych dinukleotydów, ferrytyny, hemoglobiny oraz barwnika YO-PRO-1 do wnętrza komórek ludzkich. Wykazano, że w przypadku leczenia inhibitorami PARP najskuteczniejszy efekt terapeutyczny uzyskuje się w potrójnie ujemnym raku piersi bez mutacji BRCA, co wynika z braku ścieżki naprawczej uszkodzeń DNA w obecności olaparibu. Istotnym spostrzeżeniem jest obecność białka PARP1 zarówno w jądrze komórek nowotworowych, jak i w cytoplazmie, przy czym ekspresja w cytoplazmie nie korelowała z cytotoksycznością.

W przypadku bewacyzumabu (leku działającego zewnątrzkomórkowo, wiążącego czynnik VEGF), wykluczono jego obecność wewnątrz żywych komórek oraz wykazano, że znakowanie leku wpływa na jego potencjał terapeutyczny. Niewyznakowany bewacyzumab nie wykazywał działania cytotoksycznego wobec obu testowanych linii komórkowych. Ponadto lek nie jest uwalniany z pęcherzyków do cytoplazmy, a obserwowane endosomy wynikają prawdopodobnie z konstytutywnej endocytozy zachodzącej w sposób ciągły.

Do badań nad terapeutycznymi dinukleotydami wykorzystano koniugaty dinukleotydów cap z kwasem foliowym i cholesterolem. Oba koniugaty wnikały do komórek nowotworowych, w postaci wolnej oraz związanej z komponentami komórkowymi, po upływie zaledwie godziny inkubacji.

Co istotne, Autorka wykorzystwała technikę FCS do określenia formy oligomerycznej białek wewnątrz komórki, na przykładzie ferrytyny oraz hemoglobiny. Wykazano, że 25-75% cząsteczek obecnych wewnątrz komórki to duże oligomery oraz że w komórkach żernych nie następuje całkowita degradacja ferrytyny i hemoglobiny.

Badania nad wnikaniem barwnika YO-PRO-1 wskazały na jego zdolność do wnikania do jąderka, błony jądrowej i cytoplazmy oraz że może zostać zastosowany do barwienia rRNA i tRNA żywych komórek.



Ostatnim elementem dyskutowanym w rozprawie są badania nad mechanizmami dostarczania wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem szoku osmotycznego. Wyniki wskazują, że efektywność dostarczania wzrasta wraz ze wzrostem wielkości polimeru budującego ciśnienie osmotyczne w reżimie splątania łańcuchów polimerowych. Splątanie łańcuchów zapewnia lizę pęcherzyków pinocytarnych i uwolnienie substancji do wnętrza komórki.

Należy podkreślić, że zaprezentowane wyniki zaowocowały opracowaniem odczynnika Cell-IN, umożliwiającego przekroczenie błon komórkowych, który stał się przedmiotem komercjalizacji w ICHF PAN, co zasługuje na duże uznanie.

Rozprawę kończą dwa rozdziały: wnioski końcowe i podsumowanie, wskazujące na najistotniejsze wyniki badań nad mechanizmami i efektywnością wnikania cząsteczek do komórki, formy w jakiej cząsteczka występuje oraz jej stężenia, dystrybucji między jądrem komórkowym a cytoplazmą, a także zaletami techniki FCS w badaniu internalizacji komórek.

3. Strona formalna i językowa

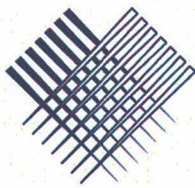
Praca ma przejrzystą strukturę i logiczny układ. Składa się z sześciu głównych rozdziałów, obejmujących: wstęp literaturowy, część metodologiczną, dyskusję wyników, wnioski końcowe, podsumowanie oraz obszerną bibliografię zawierającą 187 pozycji literaturowych. Dodatkowo, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Wyniki badań z rozdziału trzeciego zostały zaprezentowane na 39 rycinach i w 26 tabelach.

Praca została napisana poprawnym, zrozumiałym językiem naukowym. Tekst jest klarowny, logiczny i wolny od poważniejszych uchybień redakcyjnych. W rozdziale 1, Autorka użyła kilku określeń, tj. fotowypalanie, fotouszkodzenie materiału oraz kompartmenty komórki. W mojej ocenie należałoby użyć sformułowania fotowysbielenie (ang. photobleaching) oraz fotodegradacja materiału. Podobnie z „kompartamentami komórki”, bardziej odpowiednie byłoby obszary subkomórkowe lub przedziały komórkowe. Wskazane przykłady należy uznać za drobiazgi, które nie wpływają na wartość naukową pracy.

4. Oryginalność rozprawy

Rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy w zakresie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne. Osiągnięte wyniki są dobrze udokumentowane i poparte analizą literaturową.

Do oryginalnych osiągnięć Autorki z pewnością należy zaliczyć nowatorskie zastosowanie techniki FCS do ilościowej analizy terapeutyków do komórek nowotworowych, a także



uwzględnienie modelu nanolepkości do oceny mobilności tych molekuł w jądrze komórkowym i cytoplazmie.

W badaniach nad mechanizmami wnikania terapeutycznych substancji wykazano, że akumulacja leku w jądrze nie zawsze koreluje z efektem terapeutycznym, co jest bardzo istotną obserwacją w kontekście projektowania systemów dostarczania leków i wskazuje, jak istotna jest pełna charakterystyka losów leków dostarczanych do żywych komórek.

W rozprawie zaprezentowano również pierwsze ilościowe analizy potwierdzające obecność białka PARP1 (oraz jego kompleksu) nie tylko w jądrze komórkowych, ale także w cytoplazmie komórek HeLa i ujawniły różnice w lokalizacji białka PARP1 między komórkami nowotworu raka szyjki macicy a potrójnie ujemnym rakiem piersi.

Wśród oryginalnych osiągnięć o dużej wartości poznawczej należy wskazać także zaproponowanie i zweryfikowanie mechanizmu wprowadzania substancji aktywnej z wykorzystaniem reżimu splątania łańcuchów polimerowych oraz samo opracowanie mechanizmu dostarczania terapeutyków za pomocą szoku osmotycznego.

Istotnym odkryciem jest także wykazanie YO-PRO-1, jako selektywnego narzędzia do barwienia tRNA i rybosomów wewnątrzkomórkowo, daje to nowe możliwości w badaniach dynamiki RNA w komórkach.

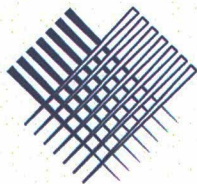
5. Uwagi i sugestie

Wyniki uzyskanych badań są oparte w dużej mierze na technice FCS. Proszę zatem o uzupełnienie następujących informacji:

- proszę o wskazanie ograniczeń techniki FCS, jakie należy uwzględnić interpretując wyniki internalizacji w żywych komórkach;
- jakie artefakty mogą wystąpić w pomiarach FCS i czy możemy je minimalizować/ograniczać?

Ponadto proszę o wyjaśnienie:

- dlaczego znakowany bewacizumab wykazuje efekt cytotoksyczny, a niewyznakowany nie?
- jaką rolę pełnią onkosomy w oporności na cytostatyki?



6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Anety Magiery, stanowi samodzielne, oryginalne opracowanie naukowe, które wnosi nową wartość poznawczą w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

W mojej ocenie praca spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.) oraz w Regulaminie Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych.

Wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr inż. Anety Magiery do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Z uwagi na imponujący dorobek naukowy doktorantki oraz wysoki poziom naukowy prezentowanych wyników i ich aplikacyjny charakter, wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.

Z-ca Dyrektora
Centrum NanoBioMedycznego

Marta Woźniak-Budych
prof. UAM dr hab. inż. Marta Woźniak-Budych