



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Henryka Mikołaja Kozłowskiego
pod tytułem
**“Hyperthermia and Immune Response: exploring the
immunoregulatory potential of fever-range temperatures “**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Henryka Kozłowskiego, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab Sylwii Wrotek, prof. UMK jest zbiorem tematycznie spójnych trzech artykułów: jednego opublikowanego w 2021 roku w *Pharmaceuticals* i jednego przyjętego do druku w *International Journal of Hyperthermia*, co wypełnia art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U. z 2021r. poz. 478. Z zgodnie z powyższym „rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru publikacji opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki (...) oraz jednego wysłanego do czasopisma naukowego w maju br., która powinna zostać opisana,

a nie spięta jak poprzednie dwie prace. Uwaga ta ma znaczenie jedynie formalne, a nie merytoryczne. Należy zaznaczyć, że niezwykle trudno jest wykonać badania i je opublikować w formie 3 prac w ciągu 4 lat dodatkowo zaburzonych przez pandemię. Panu mgr inż. Kozłowskiemu prawie się to udało, a co ważne we wszystkich pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej jest pierwszym autorem i bierze udział we wszystkich etapach przygotowania pracy.

Rozprawa przygotowana w języku angielskim składa się z dziewięciu rozdziałów obejmujących: Wstęp (6 stron), Cel badań (1 strona), Wykaz publikacji zawartych w rozprawie doktorskiej (1 strona), Publikacje (84 pozycje), Dyskusje (9 stron), Wnioski i perspektywy (1 strona), Podziękowania, finansowanie i zgody komisji bioetycznych (1 strona), Bibliografię (85 pozycje), Streszczenie (2 strony), Streszczenie w języku polskim (2 strony).

We wstępie Autor wprowadza w zagadnienie gorączki, której lecznicze efekty obserwowano i doceniano już od czasów starożytnych, oraz wynikające z jej prozdrowotnych własności aplikacyjne wykorzystanie hipertermii sztucznej w medycynie. Omawia też makrofagi jako kluczowe komórki w tym procesie. Mechanizm działania hipertermii z zakresu gorączki (FHR; tj. 39°C-41°C), szczególnie na układ immunologiczny, nie jest do końca poznany stąd praca doktorska mgr Henryka Kozłowskiego dotyczy tego aktualnego i ważnego kierunku badań.

Autor formuje trzy cele: określenie wpływu FHR na profil hematologiczny, cząsteczki regulatorowe- cytokiny i miRNA w całym

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Dr hab. Agnieszka
Wolnicka-Głubisz, prof. UJ

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6526
fax +48(12) 664 69 02
email: a.wolnicka-
glubisz@uj.edu.pl

organizmie, sprawdzenie czy FRH wpływa na zmiany fenotypowe makrofagów oraz ustalenie czy FHR modyfikuje efekty indukowane przez TLR4-zależne symulatory takie jak LPS i ekstrakt z jemioty w komórkach nowotworowych i makrofagach, co ważne cele te zostały realizowane.

Do najważniejszych i ciekawych wyników pracy doktorskiej Pana mgr inż. Kozłowskiego zaliczyć należy:

- Opracowanie modelu indukowania hipertermii u szczurów i stwierdzenie, że FRH modyfikuje pulę krążących w krwi limfocytów i granulocytów, co koreluje ze zmianami w ekspresji G-CSF, MIF1 α i wpływa na maszynę miRNA, głównie miRNA-155.
- Wykazanie, że FRH indukuje polaryzację makrofagów i zmiany ich fenotypu w kierunku M2b, nawet w obecności LPS.
- Potwierdzenie, że polaryzacja makrofagów w fenotyp M2b pod wpływem FHR odbywa się w sposób niezależny od szlaku TLR-4, który jest kluczowy dla rozwoju stanu zapalnego.
- Wykazanie, że gorączka jest ważnym składnikiem terapii opartej na ekstrakcie z jemioty, która w różny sposób wpływa na komórki raka piersi i makrofagi.

Przedstawione prace badawcze zostały zaopatrzone dodatkowo wspólną dyskusją, która napisana jest bardzo dobrze, w sposób logiczny przedstawia analizę wszystkich wyników, porównanie ich z danymi zawartymi w aktualnym światowym piśmiennictwie w sposób wyczerpujący, co wskazuje na pełną znajomość tematu przez Doktoranta.

Wnioski i pespektywy są dobrym podsumowaniem pracy, choć szkoda że Autor nie pokusił się o napisanie pespektywy dalszych badań.

Część wyników przedstawia dane zmian ekspresji na poziomie genów, a nie białek, co umniejsza wagę niektórych otrzymanych wyników. Oznaczenia IL-1 β , IL-6 COX-2 w hodowlach *in vitro*, w opublikowanej pracy, aż się prosi o potwierdzenie na poziomie ich produkcji lub sekrecji np. testem ELISA. Dlaczego Doktorant tego nie zrobił? Doktorant sugeruje wpływ FHR na NF κ B. Szkoda, że tego nie wykazał. Dlaczego Doktorant wybrał miRNA 155?

Zastosowana sonda Carboxy-DCFDA- do badania tzw. ROS należy do czułych, aczkolwiek mało specyficznych metod i nie identyfikuje poszczególnych reaktywnych form tlenu. Stres oksydacyjny jest wynikiem gromadzenia się w komórkach i tkankach nadmiaru reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA). Użyta sonda łatwo ulega utlenieniu pod wpływem

wielu tych form. Ponadto Doktorant potwierdza wzrost stężenia NO metodą Griessa.

Pewien niedosyt budzi też szata graficzna pracy. Autor nie pokusił się o przedstawienie choćby jednego schematu, który wizualnie przedstawiałby opisane zjawiska w pracy. Ponadto wyniki przedstawione głównie w postaci wykresów słupkowych, choć dane polaryzacji makrofagów pozyskane z analizy za pomocą cytometrii, aż się proszą o przedstawienie w postaci np. wykresów kropkowych (dot blots). Wyniki dotyczą wysłanego manuskryptu, które gdyby zostały opisane w innej formie mogłyby zawierać takie ryciny.

Zgodnie z obecnymi rekomendacjami zamieszcza się punkty, które umożliwiają wgląd w rzeczywisty rozrzut danych surowych (co nie jest możliwe na podstawie odchylenia standardowego średniej) i ich liczbę.

Pomimo pewnych uwag uważam, że praca doktorska Pana mgr inż. Henryka Kozłowskiego wnosi istotne informacje na temat działania FHR na układ immunologiczny. Zaobserwowane przez Doktoranta zjawisko zmiany polaryzacji makrofagów pod wpływem FHR może mieć duże znaczenie w usprawnianiu efektywności terapii nowotworów, schorzeń alergicznych, autoimmunizacyjnych, metabolicznych czy sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych (w tym choroby Alzheimera), a więc chorób związanych z zaburzeniem funkcji makrofagów, w których pożądane jest stopniowe wyciszenie stanu zapalnego.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U.z 2021r. poz. 478 i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej w Dyscyplinie Nauk Biologicznych UMK w Toruniu wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Henryka Kozłowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z poważaniem



Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ

Kraków, 12.07.2023