



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 589 22 07; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.edu.pl; <http://www.nencki.edu.pl>

Prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski,
Pracownia Biologii Mitochondriów i Metabolizmu
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 09 grudnia 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Bartosza Szymczaka**

p.t.: "Sygnalizacja purynergiczna w komórkach glejaka – badania *in vitro* nad mechanizmami patologicznymi i możliwościami terapeutycznymi"

Rozprawa doktorska Pana mgr Bartosza Szymczaka została przygotowana pod opieką naukową dr hab. Katarzyny Roszek, prof. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i dr Joanny Czarneckiej pełniącej rolę promotora pomocniczego.

Celem pracy doktorskiej mgr Bartosza Szymczaka było określenie profilu sygnalizacji purynergicznej w komórkach glejaka oraz zmian zachodzących w tym modelu komórkowym pod wpływem różnicowania komórek z wykorzystaniem kwasu retinowego, ze szczególnym naciskiem na zmiany w poziomie ekspresji i funkcjonalności receptora P2X7, a także określenie indukowanych zmian w cytofizjologii komórek oraz ich wrażliwości na chemoterapeutyki. W swojej pracy Doktorant postawił sobie cztery główne cele badawcze:

1. Charakterystyka zmian fizjologii komórek glejaka poddanych różnicowaniu, ze szczególnym uwzględnieniem zmian potencjału proliferacyjnego i migracyjnego;
2. Określenie różnic w funkcjonowaniu elementów sygnalizacji purynergicznej, w tym aktywności katalitycznej zewnątrzkomórkowych enzymów metabolizujących nukleotydy, poziomie ekspresji receptorów purynergicznych, a w szczególności izoform receptora P2X7 w komórkach glejaka poddanych procesowi różnicowania;

3. Zbadanie zmian w odpowiedzi fizjologicznej różnicowanych komórek na traktowanie ligandami receptora P2X7, w tym określenie efektu cytotoksycznego, zmian potencjału migracyjnego, a także aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych; oraz
4. Porównanie i wyjaśnienie mechanizmu zmian efektu cytotoksycznego wywołanego przez chemoterapeutyki oraz przez chemoterapeutyki podawane wraz z ligandami receptora P2X7, w niezróżnicowanych i zróżnicowanych komórkach glejaka.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji praca Pana mgr Bartosza Szymczaka stanowi zbiór 3 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2023-2024. W dwóch z nich (prace eksperymentalne) Pan mgr Bartosz Szymczak jest pierwszym autorem.

1. **Szymczak, B.**, Pegoraro, A., De Marchi, E., Grignolo, M., Maciejewski, B., Czarnecka, J., & Roszek, K. Retinoic acid-induced alterations enhance eATP-mediated anti-cancer effects in glioma cells: implications for P2X7 receptor variants as key players. 2024 Dec 1;1871(3):167611 (IF = 4,2; MNISW = 100).
2. **Szymczak, B.**, Czarnecka, J., Czach, S., Nowak, W., & Roszek, K. (2023). Purinergic approach to effective glioma treatment with temozolomide reveals synergistic anti-cancer effects mediated by P2X7 receptor. *Cellular Signalling*, 106, 110641. (IF= 4,4; MNISW = 100).
3. Adinolfi, E., De Marchi, E., Grignolo, M., **Szymczak, B.**, & Pegoraro, A. (2023). The P2X7 receptor in oncogenesis and metastatic dissemination: New insights on vesicular release and adenosinergic crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 18, 13906. (IF=4,9; MNISW = 140).

Należy podkreślić, że wszystkie trzy prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są ściśle powiązane tematycznie. Zostały one opublikowane w czasopiśmie naukowych znajdujących się na listach MNiSW (indeksowanych w bazie PubMed) oraz znajdujących się na liście filadelfijskiej (JCR). Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF) tych prac wynosi 13,3, zaś łączna punktacja MNiSW to 380 pkt. Dwie pierwsze publikacje prezentują oryginalne wyniki eksperymentalne, natomiast publikacja nr 3 jest pracą przeglądową.

Zgodnie z oświadczeniem doktoranta jego udział w powstaniu wyżej wymienionych prac był istotny i obejmował:

- w publikacji 1 i 2 – opracowanie koncepcji badań, przygotowanie przeglądu literaturowego, sporządzenie protokołów eksperymentalnych, przeprowadzenie większości doświadczeń,

analizę statystyczną wyników, przygotowanie figur, współudział w pisaniu i edycji manuskryptu oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

- w publikacji 3 przygotowanie przeglądu literatury oraz uczestnictwo w przygotowaniu oryginalnego manuskryptu,

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pana mgr Bartosza Szymczaka zrealizowano w ramach 4 projektów finansowanych przez:

- 1) Narodowe Centrum Nauki (grant MINIATURA 3, w którym kierownikiem była dr Joanna Czarnecka, promotor pomocnicza Doktoranta)
- 2) COST Action "CA21130 – P2X receptors as a therapeutic opportunity (PRESTO)" – program „Short-term Scientific Mission”, którego Doktorant był beneficjentem;
- 3) grant badawczy z funduszy IDUB UMK „Grants4NCUStudents” w którym Doktorant był kierownikiem
- 4) grant z funduszy IDUB UMK „Mobilność dla doktorantów”, w którym Doktorant był beneficjentem

Część badań została wykonana przez Doktoranta na Uniwersytecie w Ferrarze podczas odbytych dwóch miesięcznych staży naukowych (luty/ marzec 2023) oraz (czerwiec/ lipiec 2023). Staże te były sfinansowane przez wymienione przeze mnie powyżej programy:

- program „Mobilność dla doktorantów” w ramach projektu „Inicjatywa doskonałości – Uczelnia Badawcza” Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, oraz
- program COST „Short-term Scientific Mission” ze środków projektu o akronimie PRESTO.

Ocena poszczególnych rozdziałów pracy

Struktura pracy jest typowa dla tego typu opracowań. Rozprawę doktorską uzupełniają kopie artykułów składających się na zbiór publikacji.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 107 stron, z czego 5 stron stanowi spis Literatury. Rozprawa doktorska zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Całość podzielona jest na rozdziały: Wstęp (7 stron), Cel Pracy (2 strony), Materiały i Metody (6 stron), Omówienie Wyników (5 stron), Podsumowanie i Wnioski oraz Spis Literatury. W pracy cytowanych jest 69 pozycji literaturowych, w tym ponad połowa z ostatnich dziesięciu lat.

W związku z tym, że prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już poddane dogłębnej analizie na etapie recenzji przed ich publikacją w czasopiśmie naukowym, pozwolę sobie przedstawić następujące uwagi, które chciałbym przedyskutować z Doktorantem podczas obrony.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest napisany w sposób rzeczowy i syntetyczny. Według mnie mógłby być trochę bardziej rozbudowany. Dodatkowo, pomimo iż nie jest to bezpośrednio związane z tematyką rozprawy, zabrakło mi fragmentu opisującego zaburzenia sygnalizacji purynergicznej oraz udział receptorów purynergicznych w patomechanizmie różnych chorób, a nie tylko w nowotworzeniu, na którym skupił się Doktorant.

Cztery **szczegółowe cele** pracy doktorskiej mgr Bartosza Szymczaka zostały określone bardzo precyzyjnie.

Materialy i Metody, podczas lektury tej części pracy nasunęło mi dwa pytania:

- Na stronie 20, pkt. 1.2. Warunki hodowli. Doktorant podaje, że komórki były pasażowane każdorazowo po osiągnięciu stanu subkonfluencji. Czy mogę prosić o doprecyzowanie jaki to był % konfluencji?
- Czy zastosowany przez Doktoranta test rysy pozwala ocenić zmiany wyłącznie w migracji komórek czy też jest wypadkową migracji i proliferacji?

Omówienie wyników Badań:

Do tej części mam następujące uwagi:

Strona 28. drugi akapit; Doktorant pisze: „Powyższe wyniki pokazują, że pod wpływem kwasu retinowego wykreowano mikrośrodowisko guza, w którym enzymy degradujące ATP obniżyły swoją aktywność” Chciałbym zwrócić uwagę, że enzymy degradujące ATP nie obniżyły swojej aktywności. Doktorant podaje przecież wcześniej, że dochodzi do spadku poziomu enzymów degradujących ATP. Ich „bezwzględna” aktywność jest niezmienna, a obniżona zewnątrzkomórkowa aktywność hydrolityczna związana jest wyłącznie ze spadkiem poziomu enzymów za to odpowiedzialnych.

Ciekawi mnie też obserwacja poczyniona przez Doktoranta dotycząca zależności pomiędzy poziomem zewnątrzkomórkowego ATP i poziomem receptorów P2X7 w różnicowanych komórkach. Dlaczego w przypadku, kiedy tak jak pisze Doktorant „cząsteczki ATP dłużej utrzymują się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej” dochodzi także do wzrostu poziomu

receptora P2X7? Czy do wzrostu cytotoxycznosci nie wystarczylyby tylko wzrost zewnatrzkomorkowego ATP? Chcialbym poznac opinie Doktoranta na ten temat.

Dodatkowo, chcialbym prosic o uszczegolowienie i wyjasnienie zwikszonej wzraliwosci roznicowanych komorek na ATP oraz BzATP. Jaki jest mechanizm cytotoxycznosci agonistow receptora P2X7 w roznicowanych komorkach? W rozprawie brakuje mi chociazby krótkiego opisu tego mechanizmu.

Chcialbym takze aby Doktorant podczas obrony przedstawil swoja opinie dotyczaca zjawiska zwikszenia wzraliwosci na cytotoxyczne dzialanie ATP. Czy moze to byc mechanizm uniwersalny i czy dotyczy roznych komorek nowotworowych?

Wniosek koncowy

Podsumowujac, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest napisana dobrze i przedstawia nowe odkrycia badawcze. Co prawda mozna by oczekiwac bardziej rozbudowanego wstepu i dyskusji nad uzyskanymi wynikami oraz mechanistycznego podejscia do badanej hipotezy, jednakze przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczace rozprawy mgr Bartosza Szymczaka w wiekszosci maja charakter drugorzędny i w zadnym stopniu nie obnizaja wartosci merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Stwierdzam zatem, ze powierzona mi do oceny dysertacja na stopien doktora nauk scislych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr Bartosza Szymczaka spelnia warunki stawiane rozprawom na stopien doktora nauk scislych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyzszy i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Zwracam sie wobec tego do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapow przewodu doktorskiego.

Mariusz R. Więckowski