



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz
Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 25 kwietnia 2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Witko pt. "Biophysical characteristics and cellular studies of polyhydroxyoctanoate (PHO) - biodegradable polymer for biomedical applications" wykonanej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr. hab. Zenona Rajfura i dr. Macieja Guzika

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa ma charakter inderdyscyplinarny, porusza bowiem zagadnienia związane z analizą właściwości biodegradowalnych polimerów z grupy polihydroksyalkanianów i ich potencjalnym zastosowaniem w medycynie i biologii. Znajdują się w niej elementy chemii polimerów, analiz fizykochemicznych i obserwacji biologicznych; te ostatnie opierają się głównie na obserwacjach z wykorzystaniem wysokorozdzielczej mikroskopii świetlnej, zwłaszcza fluorescencyjnej.

Tematyka pracy dotyczy ważnych kwestii otrzymania polimerów, które z jednej strony będą mogły być przydatne w produkcji materiałów wykorzystywanych w medycynie, czyli biokompatybilnych, a z drugiej strony będą biodegradowalne. Poruszane w rozprawie zagadnienia doskonale wpisują się w toczącą się obecnie na całym świecie dyskusję o zasadności wykorzystywania plastiku we wszystkich niemal sferach życia oraz o potrzebie syntezy materiałów biodegradowalnych i biokompatybilnych, które mogłyby zastąpić dotychczas używane tworzywa, produkowane z paliw kopalnych. Badania przedstawione w ramach niniejszej rozprawy były wykonywane w ramach projektu LIDER, przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju promotorowi pomocniczemu, dr. Maciejowi Guzikowi.

Formalny opis rozprawy

Licząca 192 strony Rozprawa została napisana w języku angielskim i posiada w zasadzie układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się listą stosowanych skrótów (*Abbreviations*), dwustronicowymi streszczeniami (*Abstracts*) w języku polskim i angielskim, po których następują podziękowania (*Acknowledgments*), zawierające m.in. informację o finansowaniu prowadzonych przez Doktoranta badań. Po krótkim przedstawieniu celu i założeń projektu (*Aims of the research project*) znajduje się liczący 45 stron wstęp (*Introduction*), w którym zamieszczono 31 rycin i 5 tabel. Kolejny rozdział, materiały i metody (*Materials and methods*), liczy 21 stron i zawiera 13 rycin i 3 tabele. Wyniki (*Experimental results*) są przedstawione na 76 stronach i zawierają 56 rycin i 29 tabel. Po nich następuje ośmiostronicowy rozdział *Practical importance and economical aims of the research*, który można potraktować jako omówienie praktycznego znaczenia i ekonomicznych aspektów prowadzonych przez Doktoranta badań. Kolejny rozdział, dyskusja (*Discussion*), liczy 4 strony. Na piśmiennictwo (*References*) składa się 230 pozycji, głównie są to artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach, w tym znaczna ich część (ok. 1/3) to prace z ostatniej dekady. Rozprawę kończą spisy przedstawionych w rozprawie rycin i tabel, a także linki do materiałów dodatkowych (*Supplementary materials*), zawierających m.in. opisy zastosowanych w rozprawie metod oraz wyniki, których Doktorant nie umieścił w wersji papierowej rozprawy. W

rozprawie brak tradycyjnych wniosków, stanowiących przecież swoiste "take-home message". Mam nadzieję, że Doktorant pokusi się o zwięzłe ich przedstawienie podczas obrony rozprawy.

Ocena merytoryczna

W bogato ilustrowanym wstępie Doktorant dużo uwagi poświęca zagadnieniom związanym z produkcją i zastosowaniem powszechnie wykorzystywanych polimerów uzyskiwanych z paliw kopalnych. Obszernie opisuje również biopolimery zarówno te występujące naturalnie, jak i te otrzymywane syntetycznie, podkreślając że z tymi ostatnimi związane są duże nadzieje aplikacyjne. Z zainteresowaniem zapoznałam się z rysem historycznym uzyskiwania syntetycznych biopolimerów, nie zdawałam bowiem sobie sprawy, że prace te trwają już od ponad stu lat. Nieco mniej miejsca poświęcił Doktorant układowi biologicznemu, który badał podczas analizy uzyskiwanych przez siebie polimerów, a więc elementom cytoszkieletu i procesowi migracji badanych komórek. Jako biolog odczuwam tu pewien niedosyt, acz sądzę że przedstawione we wstępie informacje są w pełni wystarczające dla zrozumienia analiz prowadzonych przez Doktoranta i opisanych w dalszej części rozprawy.

Cel pracy, przedstawiony jeszcze przed wstępem, jest moim zdaniem zbyt mało wyeksponowany, a w szczególności mało czytelny jest opis poszczególnych zamierzeń. Może warto było przedstawić je w punktach, ułatwiło by to lekturę. Pomimo krytyki, natury czysto edytorskiej, pragnę podkreślić, że Doktorant podjął się ambitnego i pracochłonnego zadania - od produkcji polimerów po określenie ich właściwości fizyko-chemicznych i wpływu na komórki fibroblastów. I stwierdzam, że zadanie to w pełni zrealizował.

Realizacja zamierzeń wymagała zastosowania wielu technik badawczych, które Doktorant opisał w rozdziale materiały i metody. Sądzę jednak, że niektóre opisy były zbyt obszerne, mam tu zwłaszcza na myśli część teoretyczną dotyczącą mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Z drugiej strony można ją traktować jako skrypt dla następnych doktorantów i studentów (w tym i moich podopiecznych). Już ze spisu treści tego rozdziału widać wspomnianą wyżej interdyscyplinarność rozprawy. Znajdujemy tu bowiem opis uzyskiwania polimerów, poczynając w przypadku polihydroksyoktanianu (PHO) od hodowli bakterii szczepu *Pseudomonas putida*. Na marginesie, czy ten gatunek *Pseudomonas* nie jest chorobotwórczy, jak to jest w przypadku *P. aeruginosa*?). Opisał również techniki badania nanoindentacji, służące do poznania mechanicznych właściwości badanych polimerów Część z metod fizykochemicznych oraz uzyskanych wyników Doktorant przedstawił w formie materiałów dodatkowych (*Supplementary materials*), odsyłając czytelnika do internetu. Nie było to chyba dobre posunięcie, bo zaburzało lekturę rozprawy. Mniemam, że wyniknęło to z obszerności rozprawy. W materiałach i metodach Doktorant opisał także hodowlę badanej linii komórkowej, jaką były fibroblasty uzyskane z embrionów myszy. W tej części rozprawy uzasadnił również wybór tej właśnie linii, z którym w pełni się zgadzam. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć że niektóre z zawartych w tej części rozprawy rycin są niezbyt czytelne (np. ryciny 41, 42 i 44).

W rozdziale wyniki Doktorant opisuje uzyskane przez siebie dane, przedstawiając je na licznych rycinach i tabelach. W zasadzie wszystkie dane są poddane analizie statystycznej, acz nie udało mi się znaleźć informacji o metodyce analizy i zaznaczenia istotności statystycznej na wykresach. Zdecydowana większość rycin jest czytelna, choć opisy do wielu z nich są zbyt skrótowe (np. ryciny 62, 67, 71 i wiele innych). Myślę, że pełniejsze opisy, no i czasami większy rozmiar czcionki na wykresach, ułatwiłyby lekturę tej najważniejszej przecież części rozprawy. Niewłaściwe jest również przeniesienie opisu na następną stronę, jak to było w przypadku rycin 57, 59 czy złożonej ryciny 81.

Doktorant rozpoczął badania od scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych polimerów, PHO i polilaktydu [poli(kwasu mlekowego), PLA], który jest również polimerem biodegradowalnym. W swoich badaniach zwracał uwagę na czas "dojrzewania" obu polimerów oraz rodzaj rozpuszczalnika (etanolu, chloroformu i octanu etylu) użytego do ich otrzymania.

Uzyskane dane wskazują, że o ile rozpuszczalnik nie miał znaczącego wpływu na właściwości fizykochemiczne obu badanych polimerów, to istotny był czas po którym polimery te "stabilizowały się" mechanicznie; następowało to po ok. 7 dniach. Tu dla porządku zauważam, że nie udało mi się znaleźć w tekście odniesienia do wyników przedstawionych na rycinie 47. Z zamieszczonych w tej części rozdziału danych wynika, że wyprodukowany przez Doktoranta PHO ma właściwości fizykochemiczne zbliżone do powszechnie używanych polimerów takich, jak polistyren i polietylen, a więc wydaje się iż mógłby być alternatywą dla tych polimerów otrzymywanych z surowców naturalnych. Podobne parametry charakteryzowały polimery PLA, otrzymane przez Doktoranta z komercyjnie dostępnych granulatów.

Kolejna część wyników poświęcona jest badaniom natury biologicznej, które miały na celu sprawdzenie, czy wyprodukowany przez Doktoranta polimer PHO może być wykorzystywany w biomedycynie. Badania te rozpoczęto od sprawdzenia wpływu PHO na żywotność komórek fibroblastów i wykazał, że polimery dojrzewające 24 h i dłużej nie wpływały na żywotność komórek, a więc nie mają - podobnie jak szkło - cytotoksycznego wpływu. Doktorant używa terminów *vitality* i *viability*, czy mógłby wyjaśnić różnice między tymi pojęciami.

Następny cykl badań dotyczył sprawdzenia wpływu polimerów na morfologię i ruch komórek. Poza wspomnianymi już polimerami PHO i PLA, Doktorant prowadził badania z wykorzystaniem poliakryloamidu (PAM) o różnych stopniach sprężystości, uzyskanych poprzez manipulację stężeniami akryloamidu i czynnika sieciującego, bis-akryloamidu. Z przedstawionych analiz wynika, że kształt komórek zależał w znacznym stopniu od sprężystości i rodzaju podłoża, na którym hodowano komórki. Im mniej sprężyste było podłoże, tym komórki były bardziej rozplaszczone (mierzone to wysokością komórek i powierzchnią ich przylegania do podłoża). Z dalszych analiz wynika, że morfologia komórek hodowanych na PLA i PHO wydaje się być zbliżona do morfologii komórek hodowanych na szkłe, a więc na materiale niesprężystym i powszechnie stosowanym w hodowli komórek *in vitro*. Doktorant wnioskuje, że komórki hodowane na badanych przez niego polimerach mają zapewnione optymalne warunki, co świadczy jego zdaniem o dobrej biokompatybilności i w związku z tym przydatności tych polimerów w aplikacjach biomedycznych.

Rozumiejąc entuzjazm Doktoranta, mam jednak wrażenie, że na tym etapie badań to była zbyt daleko posunięta ocena. Jednakże wyniki kolejnych doświadczeń wydają się czynić ten wniosek bardziej prawdopodobnym. Świadczą o tym analizy migracji komórek na badanych podłożach; żaden z polimerów nie hamował migracji, acz na szkłe komórki poruszały się znacznie szybciej. Doktorant sprawdzał również wpływ rozpuszczalników używanych do wytworzenia polimerów, które jednak wydają się nie mieć statystycznie istotnego efektu na badane parametry migracji. Tu należy podkreślić, że przeprowadzane przez niego analizy migracji dotyczyły obserwacji pojedynczych komórek w czasie rzeczywistym, co wymagało przygotowania odpowiedniego warsztatu badawczego i analitycznego.

Następnie Doktorant sprawdził organizację cytoszkieletu aktynowego i mikrotubularnego w komórkach hodowanych na podłożach pokrytych badanymi przezeń polimerami. Do tego celu opracował on technikę analizy zawartości aktyny i mikrotubuli w komórce; wydaje się, że to prosty i miarodajny sposób, acz tak jak każda metoda obrazowania jest obciążona błędem, zwłaszcza w przypadku aktyny. Wybarwienie z wykorzystaniem falloidyny wyklucza bowiem z analizy pulę aktyny monomerycznej i krótkich oligomerów aktyny, do których nie przyłącza się falloidyna. Jestem przekonana, że Doktorant zdawał sobie z tego sprawę, może więc wystarczyło inaczej zatytułować ryciny (np. 92 i 93). Z przeprowadzonych przez niego analiz wynika, że oba badane polimery - PLA i PHO nie tylko zmniejszają zawartość spolimeryzowanej aktyny (niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika) w stosunku do podłoża szklanego, ale także powodują zmiany w jej rozkładzie przestrzennym w komórce, a w szczególność prowadzą do zwiększenia puli filamentów w obszarze okołojądrowym. Te zmiany były mniej zauważalne w przypadku mikrotubul. Zaobserwowano wprawdzie nieznaczny ich wzrost w komórkach hodowanych na PHO, który jak się wydaje z kolejnych analiz był głównie związany ze wzrostem ich zawartości w lamellipodium.

Dla porządku - rozumiem, że zdanie na początku strony 155 i opis dotyczący ryciny 99 są błędne. Z ciekawości zapytam, czy Doktorant zna publikacje, w których badano by wpływ badanych przez niego polimerów na proces polimeryzacji aktyny i tubuliny *in vitro*; a jeśli nie, to jakiego efektu można by się spodziewać.

Kolejna część rozprawy dotyczy perspektyw zastosowania wyników badań Doktoranta w produkcji przemysłowej. Na podstawie przeprowadzonych tu analiz można stwierdzić, że badania te są perspektywiczne i istnieją realne szanse na ich wdrożenie, zwłaszcza że istnieje popyt na takie biokompatybilne i biodegradowalne polimery.

Dyskusja jest krótka i dobrze napisana, pomimo tego omówione są w zasadzie wszystkie aspekty uzyskanych wyników, co wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta. Zabrakło mi jednak próby wskazania mechanizmu obserwowanych zmian. Np. czy wynikają one z wpływu PHO i PLA na polimeryzację głównych białek cytoszkieletu lub ich wpływu na błonę komórkową i białka w niej zawarte. Chętnie porozmawiam o tym z Doktorantem podczas obrony rozprawy.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest zredagowana w sposób staranny, bogato ilustrowana, o czym wspominałam już powyżej. Napisana jest w zasadzie poprawnym językiem angielskim, który nie jest przecież macierzystym językiem Doktoranta. Nie zauważyłam literówek i znaczących błędów gramatycznych; listę tych kilku, które spostrzegłam prześlę Doktorantowi osobiście.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Tomasza Witko ma nie tylko dużą wartość poznawczą, ale i niewątpliwie potencjał aplikacyjny. Uzyskane w trakcie pracy nad przygotowaniem rozprawy wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do rozwoju badań o charakterze praktycznym, wdrożeniowym. Trudny i wyjątkowo obszerny materiał doświadczalny, niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Doktoranta do samodzielnej pracy naukowej i prowadzenia badań natury aplikacyjnej. Doktorant jest współautorem trzech artykułów, ściśle związanych z tematyką rozprawy. Jeden z tych artykułów ma charakter metodyczno-przeglądowy i ukazał się w 2017 r. w *Postęпах Biochemii*, a dwa pozostałe opublikowano w latach 2017 i 2019 w czasopismach z listy filadelfijskiej (*Journal of Applied Polymer Science* i *Acta Physica Polonica*). Dla porządku stwierdzam, że Doktorant nie jest pierwszym autorem żadnego z tych artykułów.

W recenzji zawarłam szereg uwag i komentarzy, pragnę jednak stwierdzić, że nie umniejszają one mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy. Rozważałam nawet wystąpienie z wnioskiem o wyróżnienie, niestety zamiary te powstrzymał brak publikacji pierwszoautorskiej i chyba zbyt duża lakoniczność dyskusji.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr. inż. Tomasza Witko spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładałam wniosek do Rady Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Tomasza Witko do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk fizycznych w zakresie biofizyki.



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz