



Dr hab. Paweł Pomorski, prof. Instytutu
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego,
Polska Akademia Nauk

Warszawa, 15 września 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Wykonanej w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej Uniwersytetu Jagiellońskiego,

Autor: mgr Tomasz Jaromir Kołodziej

Tytuł: "Development of Novel Methods to Study Various Biophysical Characteristics of Living Cells"

Promotor: dr hab. Zenon Rajfur

Przedstawiana recenzja zawiera następujące sekcje: tło projektu, ogólny opis dysertacji, komentarze i wnioski końcowe.

Tło projektu

Autor zwraca w dysertacji uwagę na problem opisu ruchliwości komórek tkankowych organizmów wyższych. Podkreśla, że z jednej strony ruch komórki jest zjawiskiem złożonym, trudnym do sparametryzowania a z drugiej strony badane populacje komórek często są niejednorodne i uykają syntetycznemu opisowi. Autor mierzy się z tym problemem tworząc własną klasyfikację typów morfologicznych komórki oraz analizując zarówno parametry trajektorii jak i kształtu poruszających się komórek. Badania prowadzi na podłożach o różnej sztywności, przez co jest w stanie podzielić badane populacje komórek na wyraźne subpopulacje. Jako swego rodzaju bonus, oferuje nam również metodę pomiaru temperatury w hodowli komórkowej za pomocą nanodiamentów.

Ogólny opis dysertacji

Przedstawiona dysertacja magistra Tomasza Jaromira Kołodzieja ma klasyczny układ. Zawiera cztery typowe części: wstęp, materiały I metody, wyniki I dyskusję wyników po której następuje krótkie podsumowanie wniosków z wykonanych prac. Praca ma w sumie 126 stron wraz ze streszczeniem i spisem treści. Na końcu

dysertacji znajdujemy listę cytowanej literatury, zawierającą równo 300 pozycji. Praca jest w całości napisana w języku angielskim i towarzyszy jej streszczenie w języku polskim. Tekst czyta się dobrze, miejscami jest wręcz pasjonujący, co zdradza lekkie pióro autora. Zawiera pięćdziesiąt jeden rycin, w większości kolorowych, przedstawiających za równo wyniki jak i użyteczne schematy, pomagające zrozumieć opisywane metody badawcze. Część wyników, dla wygody czytelnika, została przedstawiona w dziewiętnastu tabelach. Zarówno ryciny jak i tabele są przygotowane starannie a zamieszczone zdjęcia są wydrukowane zdjęcia są czytelne i nie sprawiają trudności interpretacyjnych co wcale nie zdarza się tak często.

Wstęp do pracy jest długi i stanowi mniej więcej jedną trzecią całej pracy. Jest podzielony na dwie wyraźnie oddzielne części. Pierwsza to historyczny wstęp do używanej dziś metodologii obserwacyjnych badań komórki. Recenzent ma z tą częścią wstępu pewien problem, bo z jednej strony jest ona bardzo ciekawie napisana i chyba warta osobnej publikacji w dobrym, popularnonaukowym periodyku, z drugiej jest właściwie zbędna z punktu widzenia zrozumienia dalszej części dysertacji. Druga część wstępu jest rzeczywistym wstępem do przedstawionych wyników. Ta część wstępu również jest jasna i klarownie wprowadza w temat. Nie jest ani za długa ani za krótka i wypełnia doskonale swoją rolę.

Rozdział Materiały i Metody wydaje się recenzentowi z kolei nieco za krótki i pobieżny. Podczas gdy w pracy naukowej jak najbardziej na miejscu jest odsyłanie do wcześniejszych publikacji opisujących szczegóły wykorzystywanych metod, tu jednak autor powinien je opisać ze szczegółami, nie ma bowiem ograniczeń miejsca a taki opis jest po prostu wygodny dla czytelnika. Bez tego nie można łatwo ocenić jak poszczególne parametry były liczone a to utrudnia zrozumienie przedstawionych wyników.

Sercem każdej pracy naukowej są przedstawione w niej wyniki i tak też jest tutaj. Autor prowadzi nas przez skomplikowaną klasyfikację użytą do analizy ruchliwości komórek rakomięśaka Walkera (WC256). Autor dokonuje tu klasyfikacji pod względem kształtu i charakteru ruchliwości, badając zmiany subpopulacji obserwowanych komórek. To szczególnie dobrze dobrana metodyka w przypadku linii takiej jak rakomięśak, gdzie wiemy, że w populacji hodowanych komórek mamy zarówno komponent nabłonkowy (rak) jak i mesenchymalny (mięśak) o nie do końca zdefiniowanych zależnościach. Bardzo ciekawe tu są wyniki pokazujące, jak taka mieszana populacja zmienia swój charakter w zależności od tego na jakim podłożu jest hodowana. Słabością przedstawienia wyników jest tu jedynie zamieszczenie części materiału, który zdaniem recenzenta powinien znaleźć się w rozdziale Materiały i Metody, tam bowiem jest miejsce opisu jak autor konstruował swoje bloki morfomigracyjne. Nawet jeśli doprowadziłoby to do pewnych powtórzeń, opis metody powinien znajdować się przed przedstawieniem rezultatów doświadczeń, gdyż pewne dygresje metodologiczne zaciemniają przedstawiany w wynikach obraz. Po analizie ruchliwości komórek następuje część wyników poświęcona pomiarom temperatury przy pomocy nanodiamentów. Ma ona bardziej charakter „proof of concept” metody biofizycznej niż przedstawia wyniki doświadczeń istotnych dziś z punktu widzenia szeroko pojętych nauk o życiu. Niemniej jednak zdolność do pomiaru temperatury w tak małej skali robi ogromne wrażenie.



Obie części wyników są solidnie przedyskutowane w liczącym czternaście stron, osobnym rozdziale siódmym, zatytułowanym „Discussion”. Tu znów recenzentowi wydaje się, że część zatytułowana „Development of morphomigrational description” powinna się znaleźć we wstępie i jej znajomość przydałaby się czytelnikowi od samego początku opisu tej metody jak i opisu uzyskanych nią wyników.

Uwagi szczegółowe

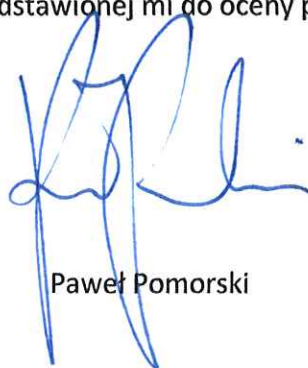
Podstawowym zastrzeżeniem do rozważań autora nad ruchliwością komórek badanego przezeń mięsakoraka jest użycie terminu EMT, przejście epitelialno-mezenchymalne. Musimy pamiętać, że EMT nie jest jedynie dziwnym procesem, istotnym przy rozwoju nowotworów, ale fundamentalnym zdarzeniem ewolucyjnym, skokiem w złożoność organizmów wynikającym z towarzyszącego mu powstania trzeciego listka zarodkowego, mezodermy. Wszystkie mięczaki, stawonogi i strunowce, w trakcie rozwoju zarodkowego tworzą mezenchymę, która powstaje z nabierających zdolności do ruchu komórek nabłonkowych. EMT może oczywiście występować w nowotworzeniu, gdzie komórki nabłonkowe zyskują charakterystykę komórek mezenchymalnych. Procesie szczególnie istotnym przy rozwoju raka, czyli nowotworu o pochodzeniu nabłonkowym. W badaniach zostały jednak użyte komórki rakomięsaka Walkera (WC256), których część ma charakterystykę mięsaka, czyli nowotworu o pochodzeniu mezenchymalnym, gdzie nie ma sensu używać terminu EMT. Nie znaczy to absolutnie, że nie możemy analizować tej linii komórkowej pod kątem mezenchymalnego zachowania pewnej subpopulacji komórek. One jak najbardziej są mezenchymalne i badanie ruchliwości i liczebności tej subpopulacji jest jak najbardziej uzasadnione. Powinno się jednak w tym kontekście jedynie unikać postulowania zmiany charakteru komórki z nabłonkowej na mezenchymalną. W tym miejscu trzeba powiedzieć, że stworzona przez doktoranta metodyka wydaje się rzeczywiście wręcz stworzona do badanie EMT i zachowania komórek rakowych. W biologii komórki powszechnie się używa białkowych markerów rodzajów komórek i tak na przykład do określenia czy komórka ma charakter mezenchymalny można użyć białek CD90 i CD105 (na tym oczywiście lista się nie kończy) i sprawdzić czy opisywany ruch komórki jest zgodny z jej wzorcem ekspresji genów.

W szczegółowej analizie ruchliwości komórek autor nieco pomija zagadnienie podziałów komórkowych, które w hodowlach zdarzają się powszechnie. Jak wiadomo, podczas podziału komórki drastycznie zmienia się zarówno adhezja jak i charakterystyka ruchowa komórki. Ciekawe wydaje się, jak autor dysertacji oddzielił tę subpopulację komórek od reszty badanych obiektów.

Recenzentowi brakuje też nieco dyskusji o wzajemnej komplementarności zmian kształtu i ruchu komórek, jako że te dwa terminy są ściśle związane. Określenie takich parametrów ruchu jak prędkość wymaga precyzyjnego określenia pozycji komórki a ta jest silnie uzależniona od jej kształtu. Recenzentowi wydaje się, że używana przez doktoranta metodyka dość skutecznie rozwiązuje ten problem, ale szkoda, że zagadnienie nie zostało dokładnie opisane we wstępie.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej opinii, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana Tomasza Jaromira Kołodzieja pod tytułem: Development of Novel Methods to Study Various Biophysical Characteristics of Living Cells w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę zatem o przyjęcie przedłożonej rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony. Przedstawiona do recenzji praca daje podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie nauk fizyczne. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo podejścia i zakres prac podjętych w ramach przygotowania dysertacji, wnoszę o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.



Paweł Pomorski