



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Kraków, dn. 13.06.2024

Prof. dr hab. inż. Jadwiga Laska
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
AGH w Krakowie

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Olgi Sylwii Adamczyk
pt. „The effects of cell – microspheres interaction on
the cytoskeletal architecture in fibroblasts”

Podstawą opracowania niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne prof. dr. hab. Jacka Golaka z dnia 18 kwietnia 2024 r. oraz dołączona rozprawa doktorska. Recenzję sporządzono zgodnie z zapisami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. oraz wytycznymi Rady Doskonałości Naukowej zawartymi w poradniku „Recenzje w postępowaniach o awans naukowy”.

1. Informacje ogólne i ocena formalna

Praca doktorska mgr Olgi Sylwii Adamczyk pt. "The effects of cell - microspheres interaction on the cytoskeletal architecture in fibroblasts" została wykonana na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego (Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego, Zakład Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej) pod kierunkiem dr hab. Zenona Rajfura, prof. UJ.



Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów
al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
tel. +48 12 617 44 47, 617 22 39, fax +48 12 617 33 71
e-mail: biomat@agh.edu.pl, www.kb.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 137 stron A4, w tym 50 stron przeglądu literatury oraz 47 stron opisu badań i dyskusji uzyskanych wyników. Autorka podzieliła zasadniczą treść pracy na siedem ponumerowanych rozdziałów z podrozdziałami, a ponadto zamieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, podsumowanie i wnioski, spis cytowanej literatury obejmujący 242 pozycje oraz spis ilustracji. Na końcu rozprawy Autorka dołączyła krótką prezentację swoich osiągnięć naukowych.

2. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Rozprawa dotyczy badań wpływu czynników mechanicznych na zachowanie komórek biologicznych. Jest to tematyka ciągle nie w pełni rozpoznana i pozostająca w sferze badań naukowych, a jak wykazała Autorka rozprawy oddziaływanie mechaniczne może prowadzić do określonych reakcji komórki. Obserwacje i wyniki badań w tym zakresie mogą mieć duże znaczenie aplikacyjne, szczególnie w rozpoznawaniu przyczyn powstawania niektórych nowotworów, a w konsekwencji w zapobieganiu im lub leczeniu.

W obszernym przeglądzie literatury Autorka wyjaśniła, kluczowe w przeprowadzonych badaniach, pojęcia cytoszkieletu, mikrofilamentów, białek uczestniczących w budowaniu cytoszkieletu oraz białek pełniących pomocnicze role w jego funkcjonowaniu, procesu endocytozy oraz scharakteryzowała wykorzystywaną powszechnie w badaniach cytoszkieletu mikroskopię fluorescencyjną. Przekaz w części literaturowej jest encyklopedyczny, klarowny i użyteczny dla czytającego, bazuje na wielu artykułach naukowych opublikowanych w ostatnich dwudziestu latach, czyli w okresie niespotykanego wcześniej przyśpieszenia w badaniach w naukach biologicznych. Przy tej okazji nadmienię, że kilkanaście odniesień literaturowych nie zawiera informacji ani o źródle ani o roku publikacji, co jest uchybieniem. Część literaturowa jest ilustrowana,

a załączone ilustracje są czytelne i ułatwiają poruszanie się po szczegółach z zakresu biologii.

Jako główny cel prac eksperymentalnych Doktorantka obrała zbadanie zachowania się fibroblastów w zależności od zastosowania podłoży różniących się modułami elastyczności oraz fizycznego oddziaływania mikrosfer polistyrenowych o średnicy 2 μm . Szczególna uwaga skierowana została na ewentualne zmiany w architekturze cytoszkieletu fibroblastów. Doktorantka zbadała zmiany struktury wszystkich składników cytoszkieletu, czyli włókna aktynowe, mikrotubule i mikrofilamenty pośrednie.

Podłoża poliakrylamidowe o różnych modułach elastyczności zostały przygotowane przez Doktorantkę według znanej procedury opublikowanej w prestiżowym *Current Protocols in Cell Biology*, a moduły sprężystości wyznaczono przy użyciu mikroskopii sił atomowych. Przygotowane zostały cztery podłoża o modułach elastyczności 40, 22, 8 i 2 kPa. Z kolei mikrosfery dostępne komercyjnie zakupiono i zastosowano w ich formie pierwotnej, a także po powierzchniowej modyfikacji fibronektyną.

Badania struktur cytoszkieletowych w warunkach oddziaływania na komórki poprzez sztywność podłoża oraz nacisk mikrosfer, przeprowadzono poprzez odpowiednie barwienie materiału biologicznego oraz efekt fluorescencji w mikrosferach.

Doktorantka wykazała, że umieszczenie mikrosfer na powierzchni komórki wyraźnie wpływa na architekturę włókien aktyny, mikrotubul i filamentów pośrednich. We wszystkich badanych przypadkach wpływ ten widać już po 15 minutach oddziaływania mikrosfer, natomiast wydłużenie czasu interakcji daje różne efekty w zależności od rodzaju białek i struktur tworzących cytoszkielet. Na histogramie na rys. 33 widać, że otoczka aktynowa i filamentów pośrednich wokół mikrosfery powiększa się po dłuższym czasie niezależnie czy jest ona pokryta fibronektyną czy nie, natomiast w wypadku mikrotubul, niemodyfikowane mikrosfery zachowują się odwrotnie, tzn. gromadzą się w pierwszych 15 minutach, a potem

otoczka maleje. Wyniki badań zostały poprawnie opisane, jednak bardzo wskazana i cenna byłaby próba wyjaśnienia, dlaczego mikrotubule zachowują się inaczej niż filamenty aktynowe i pośrednie. Czy powierzchnia białkowa mikrosfer ma znaczenie, czy jest to tylko efekt mechaniczny wynikający z większej sztywności mikrotubul niż filamentów. Jakiego typu oddziaływania lub wiązania chemiczne są możliwe pomiędzy białkami cytoszkieletu a fibronektyną lub niemodyfikowaną powierzchnią mikrosfer? Na ile obserwowane efekty są jedynie fizyczne, a na ile chemiczne. W mojej opinii eksperyment z cytochalazyną w żaden sposób nie wyjaśnił zachodzących zjawisk. Szkoda, że nie zbadano czy tworzące się „miseczki” w strukturach aktynowych nie są odcisniętym śladem po mikrosferze i świadczą jedynie o tym, że cytoszkielet w tym miejscu jest bardzo delikatny. Czy możliwa byłaby obserwacja tego odcisku w dłuższym czasie po usunięciu mikrosfery, co pozwoliłoby stwierdzić czy odkształcenie struktury jest trwałe czy cytoszkielet powróci do wcześniejszej formy? Szkoda, że Doktorantka nie przeanalizowała zmian w strukturze cytoszkieletu w kontekście całej komórki. Cytoszkielet można by, bez dużego ryzyka błędu, rozważać, jako rozwieszone w cytoplazmie sieci, w które wpadają mikrosfery.

Bardzo interesujące wyniki Doktorantka uzyskała po zastosowaniu dodatkowo podłoży poliakrylamidowych. Szkło jest podłożem bardzo sztywnym, a więc w porównaniu z nim, wszystkie podłoża akrylamidowe można uznać za miękkie. Na rys. 37 pokazano jednak dość zaskakujące wyniki, mianowicie ilość mikrosfer z otoczką struktur cytoszkieletu na podłożu szklanym jest najwyższa, a na podłożach akrylamidowych nie wzrasta wraz ze wzrostem sztywności, lecz można powiedzieć, że wręcz przeciwnie, przy czym mikrosfery pokryte fibronektyną oddziałują inaczej niż niemodyfikowane. W tym wypadku jednak znowu potrzebna byłaby obszerniejsza dyskusja, dlaczego obserwuje się takie efekty jak pokazano. Dlaczego najwięcej zagłębionych w cytoszkielet mikrosfer obserwuje się na najbardziej miękkim substracie. Czy obserwacje dla podłoży

akrylamidowych są w sprzeczności z wynikami otrzymanymi dla szkła? Z opisu wyników można odnieść wrażenie, że filamenty cytoszkieletu przemieszczają się by w szczególny sposób rozmieścić się wokół mikrosfery, a nawet ją obudować. Tymczasem może to być zwykły efekt fizyczny "ustępowania" mikrowłókien pod naciskiem mikrosfery. W konsekwencji tworzy się ich większe nagromadzenie w bezpośrednim sąsiedztwie intruza, jakim jest zagłębiająca się kulka.

Istotną częścią dla analizy wyników są badania rozmieszczenia określonych białek współdziałających z mikrotubulami. Do przeprowadzenia szczegółowych obserwacji Doktorantka wyselekcjonowała trzy białka z rodziny MAP (microtubule associated proteins), a mianowicie CLIP1, IQGAP1, MARK2 oraz zbadała ich zachowanie w zależności od warunków mechanicznych, czyli różnych podłoży, w tym szkła, oraz obecności mikrosfer. Doktorantka na str. 103 twierdzi, że jedynie CLIP1 tworzy agregaty w pobliżu mikrosfer, natomiast pozostałe dwa białka nie wykazują żadnej tendencji do organizacji. Proszę o dokładniejsze wyjaśnienie tego aspektu podczas obrony, gdyż nie podzielam w pełni tego wniosku. W odniesieniu do tych samych wyników, Doktorantka zasugerowała możliwą rolę badanych białek w endocytozie mikrosfer polimerowych. Białka te, jak wskazuje ich nazwa, współdziałają pośrednio lub bezpośrednio z mikrotubulami i nie były dotychczas postrzegane jako biorące udział w endocytozie. Postawiona teza może być słuszna, nie została jednak potwierdzona żadnymi obserwacjami. Samo zamknięcie całej mikrosfery w strukturze białka może być jedynie skutkiem różnicy właściwości fizycznych np. gęstości, i jako proces niezaprogramowany może być przyczyną zmian patologicznych w komórce. Zgadzam się jednak, że niezależnie od przyczyn wychwycenia mikrosfery przez białko, oddzielenie jej jako ciała obcego od funkcjonalnych struktur biologicznych, też byłoby ważnym procesem ochrony komórki przed mikrocząstkami z zewnątrz i także byłoby elementem endocytozy. Niewątpliwie ten wynik badań jest bardzo ciekawy

i dalsze prace byłyby bardzo wskazane. Podobnie wcześniej wspomniane badania oddziaływania mikrosfer i podłoży na cytoszkielet powinny być kontynuowane w kierunku aplikacji medycznych. W rozprawie przedstawiono wiele nowych cennych obserwacji jednak pozostawiono je bez wyjaśnienia oraz jednoznacznych wniosków. Po przeczytaniu całej pracy ma się pewien niedosyt interpretacyjny. Te niedociągnięcia mogą być jednak wyrównane podczas obrony pracy. Na pochwałę zasługuje precyzyjny dobór metod badawczych i analitycznych.

3. Mniej istotne pytania i uwagi krytyczne

W pisaniu pracy też zastosowano minimalistyczne podejście, co utrudnia czytanie i właściwe podążanie za rozumowaniem Doktorantki. Niekiedy czytelnik zmuszony jest do wielokrotnego powracania do już przeczytanych fragmentów w celu właściwej interpretacji i sformułowania wniosków. W skrajnym przypadku może to nawet spowodować błędną ocenę niektórych rezultatów. Trudno dyskutować w tej sprawie, gdyż sposób prezentacji jest bardzo indywidualny, dlatego Doktorantki nie musi się do tej uwagi odnosić. Można ją potraktować jako radę starszej koleżanki na ewentualną dalszą naukową przyszłość Doktorantki.

Poniżej kilka uwag, do których Doktorantka mogłaby się odnieść.

- 1) Doktorantka używa w całej rozprawie sformułowania „latex microspheres”, a w streszczeniu w języku polskim „kulki polistyrenowe lub lateksowe”. Z informacji producenta jednak jasno wynika, że w badaniach wykorzystywane były wyłącznie mikrosfery polistyrenowe w formie zawiesiny wodnej, czyli lateksu. Stosowanie nazwy „latex microspheres” jest w tej sytuacji nie tylko błędem nomenklaturowym, lecz wprowadza także zamieszanie merytoryczne, gdyż sugeruje, że zastosowane zostały mikrosfery gumowe o dużo większej sprężystości niż mikrosfery polistyrenowe.

- 2) Zastosowano błędne określenia istotnych parametrów podłoża. Podając wartości liczbowe, Doktorantka posługuje się zamiennie „elastycznością” lub „sztywnością”, podczas gdy należy używać pojęcia moduł sprężystości. Ta wielkość jest mierzalna i wyrażana w Pa. Sztywność jest określana jako siła potrzebna do uzyskania jednostkowego przemieszczenia (odkształcenia) i wyrażana jest w N/m. Pojęcie elastyczności, jako parametru mierzalnego, nie jest stosowane. W badaniach komórkowych dozwolone i przyjęte są pojęcia „elastyczności” lub nawet częściej „sztywności”, ale tylko do bardzo ogólnego opisu podłoża.
- 3) Pewną konsternacją wywołuje także używanie zamiennie słów „engulfed” — pochłonięte i „enveloped” — owinięte, opakowane, okryte. Pierwsze opisuje zjawisko podobne do zanurzania się, zatapiania, a drugie obudowywania czegoś jakąś inną substancją. Wydaje się, że żadne z tych zjawisk nie zachodzi w opisanych przez Doktorantkę eksperymentach. Może słowo „surrounded” byłoby tu słowem najbardziej adekwatnym i uniwersalnym, niezależnie od mechanizmu zmian. A może mikrosfera po prostu rozpycha włókna cytoszkieletu?

Praca została napisana w języku angielskim i mimo pewnych wątpliwości językowo-znaczeniowych ogólne wrażenie jest dobre, a tekst jest całkowicie zrozumiały. Pewnych drobnych błędów pisarskich Autorka nie uniknęła jak np. „in temperature” zamiast „at a/the temperature”, „długość interakcji” w streszczeniu w języku polskim zamiast „czas interakcji”, nazbyt często używany jest łącznik zamiast myślnika lub półpauzy itp.

4. Podsumowanie

Wyniki badań wykazane w rozprawie doktorskiej mgr Olgi Sylwii Adamczyk są ważne i mają potencjał aplikacyjny w leczeniu lub diagnozowaniu chorób nowotworowych. Są bardzo solidnym podłożem do

dalszych systematycznych badań biomedycznych. Doktorantka zaobserwowała zmiany w rozmieszczeniu mikrofilamentów cytoszkieletu fibroblastów zachodzące pod naciskiem mikrosfer polimerowych. Stwierdziła także wpływ sztywności podłoża na reorganizację architektury mikrofilamentów w miejscu posadowienia mikrosfery. Szkoda, że dobrze opisane rezultaty nie zostały przeanalizowane głębiej z wysunięciem tez i propozycji wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania wszystkich trzech elementów ze sobą (podłoże, mikrosfera polimerowa, komórka fibroblastu, a właściwie jej cytoszkielet), jednak obrona jest właściwym miejscem do wypełnienia tej luki. Pani mgr Olga Adamczyk wykazała się umiejętnością planowania badań i zaangażowaniem naukowym. Świadczą o tym Jej publikacje naukowe oraz udział w projektach badawczych.

5. Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Olgi Sylwii Adamczyk spełnia warunki określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Olgi Sylwii Adamczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

