



dr hab. Ewa Pięta

Zakład Fizyki Biologicznej i Nanospektroskopii

Instytut Fizyki Jądrowej PAN

ul. Radzikowskiego 152

31-342 Kraków

tel. +48 12 662 8203

e-mail: ewa.pieta@ifj.edu.pl

Kraków, dn. 06.05.2024 r.

Strona | 1

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Olgi Adamczyk

pt. „The effects of cell – microspheres interaction on the cytoskeletal architecture in fibroblasts”.

Pani mgr Olga Adamczyk wykonała swoją pracę doktorską na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką Pana dra hab. Zenona Rajfura, prof. UJ. Jest to przykład bardzo solidnie napisanej rozprawy doktorskiej. Tekst został napisany w języku angielskim, pewnie dlatego, aby praca mogła zyskać szersze grono odbiorców.

Recenzowana rozprawa doktorska to 137 stronicowe opracowanie rozpoczynające się szczegółowym spisem treści, wykazem najważniejszych skrótów i krótkim streszczeniem, zarówno w języku angielskim, jak i polskim. Dysertacja poprzedzona jest obszernym wstępem teoretycznym, zajmującym 50 stron, co stanowi ponad 1/3 objętości tekstu. Można by uznać, że to dość spora część w stosunku do całości, niemniej uważam, że tak starannie sporządzone opracowanie nie tylko dobrze wprowadza czytelnika w obszar zagadnień podejmowanych w pracy doktorskiej, ale stanowi również cenne źródło skondensowanej wiedzy o charakterze dydaktycznym. Niejednokrotnie należy się dobrze skoncentrować, aby nie pogubić się w liczbie wprowadzanych skrótów, jednak wynika to z charakteru badań i nie można mieć o to pretensji. Doskonałą wizualizacją i uzupełnieniem wprowadzanej tematyki są liczne ilustracje, samo wprowadzenie zawiera ich dokładnie 25. Wstęp podparty jest aż 219 pozycjami literaturowymi, całość rozprawy natomiast zawiera łącznie 242 odnośniki. Doktorantka powołuje się zarówno na pozycje sprzed wielu lat, zapewne istotne, w tym z 1932 roku, jak również opiera się na najnowszych opublikowanych wynikach. Troszkę szkoda, że spis bibliografii nie został ujednolicony, w niektórych pozycjach brakuje roku publikacji, numeru czasopisma (np. ref. nr 54, 62, 70, 72, 74-77), czy też wybiórczo opatrzone są numerem DOI. Nie stanowiło to jednak



żadnego problemu w dotarciu do wspomnianych pozycji, tym bardziej, że są one opatrzone tytułami.

Po zapoznaniu się z częścią wstępną, Doktorantka wprowadza czytelnika do zasadniczego celu podjętej rozprawy, co stanowi Rozdział 2. Autorka formułuje cel w bardzo syntetyczny sposób i rozdziela go na dwa główne nurty. Pierwszy z nich koncentruje się na omówieniu oddziaływania komórka – kulki lateksowe na architekturę cytoszkieletu fibroblastów hodowanych na podłożach o różnej elastyczności. Drugi natomiast skupia się na zbadaniu roli wybranych białek z rodziny MAP na proces endocytozy lateksowych mikrosfer. W tym celu Pani mgr Olga Adamczyk wybrała trzy białka oznaczone skrótami CLIP1, IQGAP1 oraz MARK2. W tym miejscu aż by się prosiło aby nieco bardziej rozwinąć te dwa wątki, niemniej Doktorantka postanowiła potrzymać jeszcze trochę czytelnika w niewiedzy bo oczywiście w dalszych częściach swojej pracy dokładnie to wyjaśnia. Za istotne uważam natomiast, że cel pracy jest określony jasno i konkretnie.

Kolejny rozdział dysertacji to opis części eksperymentalnej i obejmuje zarówno opis prowadzenia hodowli komórkowej, przygotowania substratów, mikrosfer, badanie elastyczności podłoży, czy charakterystykę metod zastosowanych do przeprowadzenia podjętych eksperymentów. Doktorantka krótko wyjaśnia również jak przebiegał sposób opracowania graficznego otrzymanych danych. Do wybranych podrozdziałów Autorka dołącza także stosowne rysunki. Całość tej części stanowi 6 stron tekstu i w mojej opinii wystarczająco szczegółowo przybliży przebieg wykonanych badań.

Po skrupulatnym i dobrze zilustrowanym wprowadzeniu w wybrany obszar badań oraz zastosowaną metodykę, rozpoczyna się najważniejszy rozdział omawianej pracy, który dotyczy otrzymanych rezultatów. Część tę stanowi obszerna prezentacja otrzymanych danych opatrzona szeregiem ilustracji, głównie zdjęć mikroskopowych. Jest to zdecydowanie bardzo mocna strona przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Z pewnością wymagała od Doktorantki starannego i skrupulatnego opracowania, co robi na mnie bardzo duże wrażenie. Dodatkowo wyniki opisane w podrozdziałach 4.1 – 4.3 zostały już opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym, co znacznie ułatwia proces recenzji (ref. nr 225: Adamczyk, O.; Baster, Z.; Szczypior, M.; Rajfur, Z. Substrate Stiffness Mediates Formation of Novel Cytoskeletal Structures in Fibroblasts during Cell–Microspheres Interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 960). Wkradł się tutaj niewielki błąd w numeracji podrozdziałów. Zdaje się, że po „4.3.1” powinno następować kolejno „4.3.2” i „4.3.3”.



Nano- lub mikrometrowe kulki lateksowe są powszechnie stosowane w badaniach biologicznych. Służą m.in. do badania procesów endocytozy i stanowią istotny element jednej z bardziej zaawansowanych metod mikroskopowych, czyli pęsety optycznej (OT). Mogą być fluorescencyjne lub niefluorescencyjne, a ich powierzchnia często może być pokryta różnymi białkami lub przeciwciałami. Kulki lateksowe, sfunkcjonalizowane konkretnym białkiem, mogą oddziaływać z białkami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej. Kulki wykorzystuje się także do badania elastyczności komórek techniką OT. Powinny one być całkowicie neutralne dla komórki i biokompatybilne, jednak, jak słusznie zauważa Doktorantka, mogą one w sposób niepożądany wpłynąć na zachowanie komórek. Temat ten jest częścią rozdziału 4.1.1, w którym przedstawione zostały wyniki uzyskane dla niepowlekanych i pokrytych fibronektyną kulek lateksowych dla dwóch czasów inkubacji (15 minut i 3 godziny). Swoje badania Autorka opiera na mysich embrionalnych fibroblastach (MEF 3T3). Na każdym rysunku pokazano obraz każdego z trzech składników cytoszkieletu — włókien aktynowych, mikrotubul i wimentyny. Zaprezentowane wyniki jasno dowodzą, że każdy rodzaj włókien cytoszkieletowych ulega przebudowie pod wpływem kulek. Zmiany można zaobserwować zarówno po 15 minutach, jak i 3 godzinach interakcji komórka-kulka. Ważnym pytaniem badawczym jakie postawiła Doktorantka było to, czy kulka jest otoczona włóknami, czyli czy nad kulką można zaobserwować elementy cytoszkieletu. W przypadku aktyny można zobaczyć, że istnieje więcej kulek pokrytych fibronektyną otoczonych włóknami aktynowymi. Dla wimentyny różnica pomiędzy liczbą kulek w otocze po 15 minutach a po 3 godzinach jest bardzo wyraźna – po 3 godzinach otulonych jest więcej kulek. Mikrotubule zachowują się inaczej i widać wyraźną różnicę w zachowaniu w zależności od zastosowanych kulek i czasu inkubacji. Ciekawa jestem czy wybrane do eksperymentów lateksowe kulki mogą być cytotoksyczne dla komórek, czy zostały w tym celu przeprowadzone jakieś teksty cytotoksyczności?

W kolejnym podrozdziale opisane zostały rezultaty otrzymane dla komórek inkubowanych z karboksyłowymi fluorescencyjnymi kulkami lateksu (pokrytymi lub niepowlekanyymi fibronektyną) i 0,1% cytochalazyną D. Okazało się, że związek ten blokuje polimeryzację aktyny i liczba spolimeryzowanych włókien jest mniejsza niż w komórkach nietraktowanych.

Następnie Doktorantka skupiła się na zbadaniu wpływu elastyczności podłoża na architekturę mikrotubuli, podkreślając przy tym ogromną rolę jak najwierniejszego odwzorowania właściwości mechanicznych naturalnego środowiska komórek. Zastosowano podłoża o elastycznościach 2 kPa, 22 kPa i 40 kPa, które pokryto fibronektyną. Komórki



inkubowano z kulkami karboksylowanego fluorescencyjnego lateksu, niepowleczoneymi lub pokrytymi fibronektyną.

Pani mgr Olga Adamczyk zaobserwowała bardzo ciekawe zjawisko, w którym mikrotubule organizują się wokół kulek lateksowych, tworząc strukturę podobną do struktur aktynowych, zwanych „kubelkami fagocytarnymi”, powstającymi w procesach endocytarnych. Dodatkowo uzyskane wyniki wykazały, że struktury przypominające miseczki mikrotubulowe powstają głównie na elastycznych podłożach.

W drugim nurcie rozwijanych przez Doktorantkę badań skoncentrowała się Ona na białkach z rodziny MAP celem zweryfikowania czy mogą być one zaangażowane w tworzenie struktur przypominających miseczki mikrotubul. Przetestowano trzy białka: CLIP1, IQGAP1 i MARK2. Dlaczego wybrano akurat te spośród tak licznej grupy białek?

Pierwszym etapem tej części badań była wizualizacja lokalizacji komórkowej badanego białka podczas procesu interakcji kulka-komórka. Do określenia położenia białka w ciele komórki zastosowano technikę rekonstrukcji obrazu 3D. W przypadku komórek hodowanych na szkle zaobserwowano, że IQGAP1 lokalizuje się w jądrze, ale gdy komórki wysiewa się na elastycznym podłożu, IQGAP1 lokalizuje się w cytoplazmie. Nie widać tego w przypadku białka CLIP1. Ciekawe rezultaty otrzymano dla białka MARK2, które wykazało silną akumulację w obszarze jądrowym, zarówno w podłożach szklanych, jak i elastycznych. W większości przypadków kulki lateksowe powodowały przegrupowanie mikrotubul.

Autorka podkreśla, że tego typu badania mogą być kluczowe dla lepszego zrozumienia natury i modeli behawioralnych tych białek, a w efekcie pomocne w badaniu komórek nowotworowych. Ciekawa jestem czy Doktorantka wykonywała podobne eksperymenty z udziałem innych linii komórkowych, zwłaszcza nowotworowych? Jak wyglądają doniesienia literaturowe w tym temacie? Jednak reakcja komórek nowotworowych może być znacząco różna. Na koniec, z racji na tak szerokie i obiecujące rezultaty opisane w pracy, chciałabym zapytać Doktorantkę co wskazałaby jako swoje największe osiągnięcie w ramach niniejszej rozprawy?

Pani mgr Olga Adamczyk decydując się na zredagowanie pracy w języku angielskim musiała włożyć dodatkowy trud, jednak zaowocuje to z pewnością zwiększeniem jej zasięgu i dzięki temu zyska szersze grono odbiorców. Czytając pracę napotkałam na kilka błędów interpunkcyjnych. W niektórych miejscach, w zależności od kontekstu zdania, brak jest przedimków określonych bądź nieokreślonych. Zauważyłam też drobne błędy gramatyczne, a niektóre zdania sformułowałabym inaczej. Niemniej nie posiadam kwalifikacji w tej dziedzinie, być może Doktorantka sama do nich dotrze. Chciałabym zaznaczyć, że nie wpływa to w żaden



sposób na moją ocenę rozprawy i jej odbiór jako całości. Pracę czyta się dobrze, zarówno jej układ, jak i następujące po sobie akapity jasno i logicznie po sobie następują.

Pani mgr Olga Adamczyk jest łącznie współautorką czterech publikacji w czasopismach recenzowanych. Brała również udział w licznych konferencjach, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych. Swoje wyniki prezentowała także w formie wystąpień ustnych. Doktorantka odbyła także trzy staże zagraniczne. Na uwagę zasługuje fakt, iż realizowała Ona cztery projekty oscylujące wokół zastosowania zaawansowanych technik optycznych.

Reasumując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. „The effects of cell – microspheres interaction on the cytoskeletal architecture in fibroblasts” spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim określonym w Ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki *Fizyczne* o dopuszczenie Pani mgr Olgi Adamczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem