

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr. Tomasza Jaromira Kołodzieja,

pt. "Development of novel methods to study various biophysical characteristics of living cells"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Kołodzieja, została wykonana w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej, Instytutu Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem dr. hab. Zenona Rajfura profesora UJ jako promotora.

Podstawą sporządzenia recenzji jest w zakresie formalnym pismo z dnia 28 czerwca 2023 r. Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego Pana prof. dr hab. Jacka Golaka otrzymane w dniu 4 lipca 2023 r. oraz wcześniejsza uchwała tamtejszej Rady Dyscypliny, a w zakresie merytorycznym „Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. z 2016 roku poz. 882).

1. OPINIA OGÓLNA

Rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Kołodzieja dotyczy nowatorskiego podejścia do badań zachowania żywych komórek dzięki wykorzystaniu mikroskopii optycznej i rozwojowi nowych metod eksperymentalno-analitycznych. Zagadnienie migracji komórek jest przedmiotem dużego zainteresowania środowiska naukowego z uwagi na konieczność zrozumienia procesów chorobowych zachodzących w organizmach zwierząt i ludzi. Zrozumienie procesów nowotworowych, a zwłaszcza metastazy jest ważnym elementem w walce z chorobami nowotworowymi. Zagadnieniem migracji komórek zajmują się naukowcy z wielu dziedzin starając się zdobyć wiedzę, która przybliży ludzkość do wciąż nierównej walki z chorobami cywilizacyjnymi XXI wieku. Zatem nie tylko medycy, biolodzy, chemicy, biochemicy, genetycy ale też fizycy i biofizycy. Wszyscy mają wspólny cel – wygrać tę walkę. Przykładem tej walki jest właśnie rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Kołodzieja.

W tej pracy, doktorant postawił sobie za cel opracowanie nowych metod badawczych aby lepiej poznać heterogeniczność komórek nowotworowych i zachowania komórek migrujących, a także wprowadzić pomiar lokalnych temperatur do badań z zakresu mechanobiologii. Rozprawę stanowi 147. Stronicowa monografia napisana w języku angielskim, zawierająca spis treści, listę użytych skrótów i symboli, streszczenie w języku polskim i angielskim, dość obszerny wstęp, rozdział opisujący materiał badawczy i metody, rozdział przedstawiający wyniki prowadzonych badań – jest to najobszerniejszy rozdział w rozprawie, dyskusję, wnioski oraz wykaz 300. pozycji literaturowych cytowanych w tekście. Rozdział 6. zawierający wyniki badań podzielony jest na kilka podrozdziałów, ale generalnie dotyczy trzech zagadnień: pierwsze przedstawia wykorzystanie mikroskopowej fotografii poklatkowej i dynamicznej analizy stanu komórek; drugie dotyczy nowej metodologii analizy kształtu i migracji komórek; a trzecie przedstawia wykorzystanie metody Optycznie Wykrywanego Rezonansu Magnetycznego oraz Mikroskopii Sił Trakcyjnych do badań własności fizycznych i procesów mechanobiologicznych. Znaczna część rozprawy została opublikowana 7 lipca 2023 r., w trakcie

recenzowania niniejszej rozprawy i ukazała się w *Scientific Reports* **13**, Article number: 11006 (2023) (poz. 234 w wykazie literatury).

Z przyjemnością stwierdzam, że rozprawa została przygotowana bardzo starannie i na wysokim poziomie dydaktycznym, choć autor nie ustrzegł się drobnych niedociągnięć. Bardzo dobrze opracowany wstęp wprowadza czytelnika w tajniki zagadnienia, jasno sformułowany cel badań, staranny opis zagadnień eksperymentalnych oraz przeprowadzona dyskusja i wnioski, sprawiają dużą przyjemność lektury tej rozprawy.

Zagadnienia omawiane w rozprawie są bardzo interesujące i ważne z punktu widzenia nie tylko badań podstawowych, ale także poszukiwań różnorodnych metod walki z chorobami cywilizacyjnymi XXI wieku.

2. OCENA MERYTORYCZNA

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej została sporządzona z uwzględnieniem następujących kryteriów, tj.:

- 1) ocena ogólnej wiedzy teoretycznej doktoranta;
- 2) ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej doktoranta;
- 3) ocena oryginalności rozwiązania problemu naukowego, oryginalności rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej.

Ad 1)

Dość obszerny rozdział 4 będący wstępem do niniejszej rozprawy wprowadza czytelnika krok po kroku do zagadnienia migracji komórek spowodowanych niewątpliwie działaniem sił, zarówno wewnętrznych jak i między komórkowych czy oddziaływania z podłożem. Przejście do omówienia aspektów fizycznych zagadnienia poprzedzone jest krótkim, bardzo ciekawym opisem historycznym. Podrozdział 4.3 poświęcony jest zastosowaniom elastycznych podłoży polimerowych do badań *in vivo* żywych komórek. Autor wskazuje na oddziaływania jakie występują pomiędzy komórką a macierzą zewnątrzkomórkową, tłumacząc jakie elementy komórki odpowiadają za jej przyleganie do podłoża oraz jakie siły powodują jej przemieszczanie się. Przywołany jest rachunek prowadzący do rozwiązania Boussinesq'a z transformatą Fouriera, pozwalający obliczyć przemieszczenie obiektu w zadanej odległości od punktu działania siły. Niestety, przedstawione wzory na stronie nr 10 pozbawione są pełnego opisu, co oznaczają poszczególne symbole. Samo odesłanie do literatury nie ułatwia czytelnikowi pełnego zrozumienia. Nie można też zapisać, że wektor r_{ij} równy jest różnicy punktów p_i i p_j !

Następnie opisane są oddziaływania komórek z podłożami elastycznymi – omówienie zachowań oraz występowania sił trakcyjnych, metod obserwacji dynamiki komórkowej poprzez zastosowanie mikroskopii poklatkowej. Autor zaznajamia czytelnika z migracją mezenchymalną, ameboidalną komórek, wskazując na konkretne przykłady linii komórkowych (linia MEF 3T3 – komórki mysich fibroblastów oraz komórki keratynocytów nabłonka ryb, odpowiednio) jak również inne typy migracji złożonych jak w przypadku pęcherzyków z komórek nowotworowych linii WC256. Omawiana jest też migracja kolektywna. Autor wyjaśnia rolę jaką odgrywa migracja komórek w przerzutowości komórek nowotworowych.

Kolejne podrozdziały poświęcone są omówieniu zagadnienia pomiaru temperatury lokalnej oraz podstawy fizyczne mechanizmu Optycznego Wykrywania Rezonansu Magnetycznego.

Po takim kursie podstaw teoretycznych badanych zagadnień, czytelnik ma pełny obraz tematyki rozprawy, doboru metod badawczych, co jednoznacznie potwierdza dobrą znajomość wiedzy teoretycznej doktoranta w zakresie realizowanej tematyki. Dodatkowo, potwierdzeniem tej znajomości jest bardzo bogaty dobór literatury.

Ad 2)

Potwierdzeniem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej doktoranta jest niewątpliwie rozdział 5 opisujący materiał badawczy i wybrane metody. Autor omawia szczegółowo procedury przygotowania podłoży, hodowli komórkowych, funkcjonalizacji powierzchni diamentów dla metody DLS oraz charakterystyki rozmiarów cząstek dla pomiarów temperatury lokalnej. Doktorant dokonuje charakterystyki podłoży i opisuje układ aparaturowy i jego optymalizację dla pomiarów metodą Optycznego Wykrywania Rezonansu Magnetycznego. Podobnie przedstawione są szczegóły pomiarów dynamiki komórkowej, analizy migracji komórek i ich kształtu jak również eksperymentów ODMR-TFM (Optycznie Wykrywany Rezonans Magnetyczny - Mikroskopia Sił Trakcyjnych).

Ponad wszelką wątpliwość, potwierdzeniem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej doktoranta jest również, najobszerniejszy i zarazem najważniejszy rozdział rozprawy przedstawiający wyniki. Konstrukcja rozdziału świadczy o dogłębnym jego przemyśleniu i pełnej konsekwencji w korelacji z wcześniejszymi rozdziałami. Stanowi on również uzupełnienie, rozwinięcie rozdziału 5. Przedstawiona metodologia rozprawy i otrzymane wyniki świadczą o osiągnięciu celów jakie postawił sobie mgr Tomasz Kołodziej.

Niestety, tutaj również muszę zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia i błędy jakie pojawiły się w tych rozdziałach.

W tabeli nr 6, jednostka parametru jest błędna, albowiem powinno być $1/\mu\text{m}$.

Na stronie 70 nie jest jasne wg jakiej zasady mierzony jest kąt uMM. Brak jednoznacznego określenia sposobu pomiaru tego kąta rzutuje na przedstawiony wynik na rysunku 24. Tutaj trudno jest mi się zgodzić ze stwierdzeniem, że miary tych kątów są prawie identyczne. Co do wartości TAK SA, ale to nie jest „ten sam kąt”. Autor, dopiero później słusznie zauważa, że jest to niejednoznaczność i stąd konieczność wprowadzenia kąta sMM. Z drugiej strony zastanawiam się czy w ogóle potrzeba była wprowadzania kąta uMM?

Pojawienie się oznaczenia $\Delta\phi$ pod rysunkiem 27 wydaje się być z nim w sprzeczności.

Ad 3)

Na oryginalność przedstawionych badań składa się kilka elementów. Po pierwsze mgr Tomasz Kołodziej wprowadza nowe podejście do zagadnienia opisu zjawiska migracji komórek. Opis morfologii komórki i jej migracji zastępuje jednym, który nazywa zjawiskiem morfomigracyjnym będącym opisanym przez dwa nowe parametry: kąt sMM (signed MorphoMigrational angle) oraz M.A. (Major Axis dynamics) i porównuje je z istniejącymi parametrami – kąt obrotu i wydłużenie kształtu. W ten sposób doktorant zaproponował opis czterech parametrów określających morfomigracyjne zachowania komórek. Te parametry to: 1) kierunek przemieszczenia z uwzględnieniem kształtu komórki, 2) dynamika kształtu komórki, 3) wielkość zmiany kierunku komórki oraz 4) wydłużenie kształtu komórki. Zastosowanie mikroskopii poklatkowej pozwoliło na prawidłowe określenie

dynamiki migracji komórek jak również ich heterogeniczności. Bazując na statycznych obrazach, analizując mezenchymalne komórki ze słabo rozróżnialnymi lamellipodiami można było błędnie zakwalifikować jako komórki niepolarne. Choć z drugiej strony należy pamiętać, że pokrycie podłoża fibronektyną może mieć istotny wpływ na adhezję i morfologię komórek.

Po drugie, w pracy wykazano, że morfologia i strategia przemieszczania się komórek może ulegać istotnym zmianom w czasie. Spowodowane to jest pojawianiem się subpopulacji w obrębie danej linii komórkowej. Wykazano, że może zachodzić wiele transformacji i mogą one być odwracalne. Dotychczas uważano, że transformacje AMT i MAT zachodzą jedynie na drodze chemicznej. Również, zaobserwowano różnice prędkości migracji ameboidalnych w zależności od sztywności podłoża. Na sztywniejszych podłożach komórki preferują mezenchymalny i niepolarny stan, natomiast elastyczne podłoża skłaniają do mniej adherentnej ameboidalnej formy. Znajomość preferowanych form może mieć istotne znaczenie w opracowaniu terapii. Określono parametry biomechaniczne komórek, które opisano językiem fizyki i matematyki co pozwoliło na ilościowe opisanie własności komórek i ich zachowań.

Po trzecie, podczas realizacji badań, doktorant rozwinął i zoptymalizował technikę ODMR-FTM do równoczesnego pomiaru temperatury lokalnej i siły trakcji komórek. Pozwoliło to na precyzyjne określenie parametrów termicznych komórek podczas przeprowadzania eksperymentów z żywym materiałem biologicznym tak, aby nie spowodować jego uszkodzenia. Należy podkreślić, że najprawdopodobniej, zgodnie z przeprowadzonym rozeznaniem przez doktoranta, jest to pierwsze zastosowanie takiego połączenia technik ODMR i FTM, co może zapoczątkować nowe badania biologii komórki.

3. WNIOSKI I KONKLUZJA KOŃCOWA

Rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Kołodzieja stanowi przykład bardzo dobrze zaplanowanych nowatorskich badań rzucających światło na możliwość ich wykorzystania do walki z chorobami cywilizacyjnymi XXI wieku. Nowatorskie podejście do opisu właściwości mechanicznych komórek pozwala na pogłębienie naszej wiedzy w tym zakresie. Mimo wcześniej wspomnianych bardzo drobnych uwag stwierdzam, że rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Jaromira Kołodzieja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, natomiast na podstawie pozytywnej oceny każdego z powyższych kryteriów, stwierdzam też, że kandydat do stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne, pan mgr Tomasz Jaromir Kołodziej spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882). Dlatego też, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pana mgr. Tomasza Jaromira Kołodzieja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, zgodnie z Uchwałą nr 8.XII/2019 Rady Dyscypliny NAUKI FIZYCZNE Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z dnia 19 grudnia 2019 roku w sprawie ustalenia kryteriów wyróżnienia prac doktorskich, w oparciu o pkt 1c tej Uchwały wnoszę o jej **wyróżnienie**. Przedstawione wyniki zawarte w rozprawie zostały opublikowane w bardzo prestiżowym czasopiśmie *Scientific Reports* i, jak wynika z powyżej oceny, jakość rozprawy i jej oryginalność świadczy o wzorowym podejściu do badań i może być dla innych przykładem do naśladowania.

Wojciech
Maria
Kwiatek

Elektronicznie
podpisany przez
Wojciech Maria Kwiatek
Data: 2023.09.04
13:27:28 +02'00'