

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

Warszawa, 30 lipca 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Wykonanej w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej Uniwersytetu Jagiellońskiego,

Autor: mgr Karolina Maria Feliksiak

Tytuł: "Architecture of the Vimentin Cytoskeleton in Mouse Embryonic Fibroblasts Cultured on Various Biopolymers"

Promotor: dr hab. Zenon Rajfur, prof. UJ

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

Tło projektu

Autorka porusza bardzo ciekawe zagadnienie wpływu adhezji do podłoża na stan cytoszkieletu wimentynowego, ze szczególnym naciskiem położonym na mechaniczne przenoszenie informacji z zewnątrz komórki do jej struktur wewnętrznych przy pomocy struktury cytoszkieletu.

Ogólny opis dysertacji

Przedstawiona dysertacja magister Karoliny Feliksiak ma układ klasyczny. Zawiera cztery typowe części: wprowadzenie, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję wyników po której następuje krótkie podsumowanie wniosków z wykonanych doświadczeń. Praca jest zwięzła i ma w sumie 79 stron wraz ze streszczeniem i spisem treści. Na końcu dysertacji znajdujemy listę cytowanej literatury, zawierającą 121 pozycji. Praca jest w całości napisana w języku angielskim i towarzyszy jej streszczenie w języku polskim. Pracy towarzyszy 26 rycin, ujętych w osobnym spisie. Pracy towarzyszy również wygodny spis skrótów i spis publikacji autorki. Pracy towarzyszą streszczenia w dwóch językach, polskim i angielskim.

Tekst czyta się bardzo dobrze, język jest płynny i żywy. Czasem nawet zbyt kwiecisty, recenzent bowiem nie do końca rozumie w jakim sensie jądro komórkowe jest Świętym Graalem badaczy (s. 23).

Recenzent miał pewne trudności ze zrozumieniem systemu numeracji rozdziałów, założył więc, że rozdziały od 1 do 6 stanowią wstęp, rozdział 7 to Materiały i Metody, 8 to Wyniki a 9 to dyskusja tychże.

Wstęp do pracy jest długi ma 25 stron i stanowi mniej więcej jedną czwartą całej pracy. Jest podzielony na trzy wyraźnie oddzielne części. Pierwsza to detaliczny opis tych składników cytoszkieletu. Rozdział jest nieco zbyt rozbudowany, w końcu autorka skupia się na funkcjach włókien pośrednich. Nie ma chyba uzasadnienia wspominanie motorów molekularnych krocących po mikrotubulach, zwłaszcza jeśli pomija się motory krocące po mikrofilamentach i nie zwraca uwagi, że tu włókna pośrednie są wyjątkiem i nie ma motorów molekularnych krocących po tych włóknach. Co zrozumiałe, najdłuższy jest podrozdział poświęcony włóknom pośrednim a szczególnie wimentynie. Autorka słusznie opisuje też anatomię jądra komórkowego, podkreślając rolę lamin w jego strukturze. Szkoda, że nie wspomina o teorii, w której wszystkie włókna pośrednie właśnie od lamin pochodzą. Na koniec autorka opisuje rolę cytoszkieletu w mechanotransdukcji. Druga część wstępu jest poświęcona badanym powierzchniom i związkom chemicznym, które je tworzą. Autorka badane związki przedstawia na tle innych plastików i opisuje ich własności i metody syntezy. Opis jest wyczerpujący i więcej niż wystarczający. Trzecia część wstępu opisuje metodę mikroskopii konfokalnej i chyba powinna zostać umieszczona w rozdziale Materiały i Metody.

Rozdział Materiały i Metody jest bardzo krótki i pobieżny. Nie znajdziemy w nim podstawowych parametrów używanych obiektywów, nie poznamy zatem rozdzielczości przedstawionych obrazów. W tym rozdziale powinien znaleźć się opis metody analizy cytoszkieletu wimentynowego, który znajdujemy w Wynikach. Powinien być on również rozbudowany, gdyż zdanie ze strony 50 „each single cell image was at first adjusted” nie wyjaśnia wykonywanej procedury.

Sercem każdej pracy naukowej są przedstawione w niej wyniki. Autorka przedstawia w nim absolutnie przepiękne mikrofotografie, doskonale przedstawiając fundamentalne zmiany, jakim podlega cytoszkielet wimentynowy w zależności od tego na jakim podłożu komórki są hodowane. Obrazom towarzyszy ilościowy opis zachodzących w cytoszkiecie zmian, poparty analizą statystyczną. Na koniec autorka pokazuje wpływ zaobserwowanych zmian na trójwymiarową geometrię jądra komórkowego, ze szczególną uwagą poświęconą pojawianiu się podłużnych wpukleń na powierzchni jądra.

Obie części wyników są przedyskutowane w liczącym osiem stron, osobnym rozdziale, zatytułowanym „Discussion”. Rozdział bardzo krótko przedstawia wyniki na tle literatury.

Uwagi szczegółowe

We wstępie lub dyskusji, recenzentowi brakuje jakiegokolwiek odniesienia do teorii Donalda Ingbera i jego „tensegrity”. W kontekście tematyki pracy byłoby to jak najbardziej uzasadnione, zwłaszcza, że koncepcja ta nie jest nowa.

Szkoda, że części poświęconej tworzywom wykorzystanym w badaniach autorka nie zwraca uwagi na fakt, że polimleczany (PLA) odgrywają dziś fundamentalną rolę w rozwoju druku 3D, co jest istotne choćby z punktu widzenia rozwoju endoprotez. Autorka też nieco przesadza z naturalnością, zarówno PHA jak i PLA jako tworzywa, należą w końcu do klasy poliestrów (co autorka sama zauważa na stronie 31). PLA w warunkach naturalnych rozkłada się około 100 lat, nie szybciej niż inne plastiki i wymaga przemysłowego kompostowania, w wysokiej temperaturze, by stan ten zmienić. Wreszcie, na tejże stronie 31 autorka stwierdza, że PLA ma „great organoleptic features”, czy to znaczy że jest smaczny?

Recenzent też nie znajduje w pracy uzasadnienia dla wybranej metody ilościowej analizy cytoszkieletu wimentynowego, opartej na progowaniu obrazu mikroskopowego. Nawet optymalnie wybrany voxel, pochodzący z mikroskopu konfokalnego, ma wymiary $\sim 200 \times \sim 200 \times \sim 500$ nm. W takim prostopadłościanie mieszczą się tysiące monomerów wimentyny. Progowanie zatem daje nam metodę bardzo zgrubną, czy autorka nie sądzi, że powinna brać pod uwagę średnią jasność takiego voxela, proporcjonalną do liczby znajdujących się w nim znaczników fluorescencyjnych związanych z cząsteczkami wimentyny? Tutaj czytanie utrudniają braki w opisie używanych metod: autorka nie podaje jakich używała obiektywów, jaka miały one aperturę numeryczną i co za tym idzie rozdzielczość, czy też z jakiej liczby skrawków optycznych, tworzone były, widoczne na ilustracjach, przekroje komórek w osiach X-Z i Y-Z. Pewne zastrzeżenia budzi też Figura 12, gdzie unit – length filaments (ULFs) są kompletnie niewidoczne.

Na stronie 58, autorka sugeruje, że PLA może zmieniać pH pożywki. To wątpliwe, jako że pożywka zazwyczaj jest buforowana a w dodatku zawiera czerwień fenolową i zmiany pH są dobrze widoczne. Ewentualne zmiany powinny być zatem odnotowane.

Autorka używa również zamiennie terminów zwilżalność i hydrofilowość. Niby opisują one to samo, ale mierzy się je zupełnie inaczej, podkreślają zupełnie inne aspekty zjawiska i pomiar zwilżalności stanowi tylko jedno z podejść tu stosowanych.

Na koniec, recenzent żałuje, że jako kontroli negatywnej autorka nie zbadała tych samych komórek, sztucznie utrzymanych w zawiesinie, co mogłoby rzucić ciekawe światło na to w jakich warunkach formują się komórki o anatomii typu “nutshell”.

Recenzent pragnie podkreślić, że wzmiankowane uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji a jedynie wskazują o ile mogłaby być ona jeszcze lepsza, gdyby autorka tylko zechciała.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej opinii, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani Magister Karoliny Marii Feliksiak pod tytułem: „Architecture of the Vimentin Cytoskeleton in Mouse Embryonic Fibroblasts Cultured on Various Biopolymers” 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.

Paweł Pomorski

