

Poznań, dnia 20 kwietnia 2020 r.

dr hab. n. farm. Michał Moritz

Zakład Chemii Ogólnej i Analitycznej
Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej
Wydział Technologii Chemicznej
Politechnika Poznańska
ul. Berdychowo 4
60-965 Poznań
tel. (61) 665-23-16
e-mail: michal.moritz@put.poznan.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Jagody Dominiki Litowczenko-Cybulskiej

p.t. „Wpływ topografii (nano)materiałów na zachowanie ludzkich komórek neuralnych”

wykonanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. Anny Goździckiej-Józefiak

prof. dra hab. Stefana Jurgi

dr Alicji Warowickiej (promotor pomocniczy)

1. Przesłanki formalno-prawne przygotowania oceny rozprawy doktorskiej

Podstawą wykonania oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Jagody Dominiki Litowczenko-Cybulskiej było pismo Pana Prof. dra hab. Przemysława Wojtaszka z dnia 3 marca 2020 roku z prośbą o dokonanie oceny przedmiotowej pracy doktorskiej, zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Biologii UAM z dnia 24 czerwca 2019 roku.

Praca doktorska została wykonana w Centrum NanoBioMedycznym oraz Zakładzie Wirusologii Molekularnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

2. Uwagi ogólne dotyczące problematyki badawczej podjętej w rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy tematyki wzrostu i różnicowania ludzkich komórek neuralnych w ujęciu ich potencjalnego zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Tematyka badań ma charakter interdyscyplinarny i obejmuje zagadnienia dotyczące inżynierii materiałów (stosowanie matryc krzemowo-złotych), biologii molekularnej (badania z zastosowaniem linii komórkowych) oraz chemii analitycznej (np. identyfikacja białek z zastosowaniem metody LC-MS/MS). Ponadto w swoich badaniach Doktorantka stosowała metody instrumentalne takie jak mikroskopia sił atomowych (AFM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mikroskopia konfokalna. Jako „miarę” oddziaływania komórek neuralnych z powierzchnią stosowanych nośników, różniących się topografią powierzchni, stosowano analizę markerów różnicowania (OLIG2, GALC, DCX, MAP2, SYP) oraz analizę proteomu komórek. Podjęta tematyka badawcza wydaje się interesująca z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, ponieważ dotyczy wpływu zewnętrznego środowiska w postaci stosowanych podłoży na wzrost i różnicowanie komórek nerwowych. Z kolei dysfunkcja komórek nerwowych leży u podstaw schorzeń neurodegeneracyjnych takich jak chociażby choroba Alzheimerera czy Parkinsona.

3. Ocena układu pracy oraz ocena merytoryczna

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla większości prac badawczych. Praca jest dość obszerna i liczy 235 stron. Wstęp liczący 30 stron, uznać można za dość zwięzłą część literaturową pracy, w której Autorka opisuje rys historyczny oraz aktualny stan wiedzy dotyczący przedmiotu pracy (zastosowanie nanotechnologii w medycynie regeneracyjnej, rusztowań dla komórek, znaczenia komórek macierzystych oraz procesu neurogenezy). Ta część dzieła napisana jest dość zrozumiale, jednak mam pewne uwagi natury technicznej:

- str. 5, podrozdział 1.2., stosowane jest określenie farmaceutyka, powinien zostać użyty termin nauki farmaceutyczne lub farmacja;
- Autorka w tej części pracy, jak i w całej jej objętości stosuje numerację cytowanego piśmiennictwa pozbawioną przecinków (występują tylko spacje), co w zależności od „zagęszczenia” tekstu może utrudniać „odkodowanie” cytowanej literatury;
- we wstępie nie podano definicji nanomateriałów, choć tytuł rozprawy doktorskiej nawiązuje do nanotechnologii. Nie określono też, co to jest „skala nano” (termin stosowany na str. 6);
- zamiast określania „nanopor” (str. 9) powinien zostać użyty termin „nanoporów”;
- w pracy brakuje numeracji niektórych podrozdziałów np. w podrozdziale 1.4. (Komórki macierzyste można podzielić na....., Typy komórek macierzystych, Wybrane typy komórek macierzystych pochodzenia nieembrionalnego), w podrozdziale 1.5. (Rys historyczny, Źródła pobrania neuralnych komórek macierzystych, Ogólna funkcja neuralnych..., Ekspresja biomarkerów). Wprowadza to pewien nieporządek redakcyjny pracy.

Po wstępie Doktorantka określa główny cel pracy, którym jest zbadanie wzrostu wybranych neuralnych linii komórkowych na różnych typach podłoży o określonej topografii powierzchni. Cel ten realizowany miał być poprzez między innymi, otrzymanie odpowiednich podłoży krzemowo-złoty, ich charakterystykę z zastosowaniem mikroskopii SEM oraz AFM. Wpływ stosowanych podłoży na wzrost komórek dokonany miał być z użyciem mikroskopii SEM i AFM, zaś rozwój komórek scharakteryzowany poprzez analizę czynników markerowych z zastosowaniem metod immunocytochemicznych oraz mikroskopii konfokalnej, a także analizę proteomiczną.

Kolejną częścią rozprawy jest rozdział „Materiały i metody” liczący 30 stron. W tej części pracy Doktorantka opisuje stosowane podczas badań linie komórkowe oraz podaje ogólny opis stosowanych nośników komórek. W rozdziale tym Autorka dość szczegółowo przedstawia stosowane techniki mikroskopowe uwzględniając rys historyczny każdej z metod oraz zasadę wykonywania analiz mikroskopowych. Uwagi do tej części pracy są następujące:

- w rozdziale „Bufory, roztwory” nie podano numerów katalogowych stosowanych odczynników, ani ich czystości (kategorii zastosowań); W przypadku roztworów nie sprecyzowano, jakie jest stężenie procentowe poszczególnych substancji (m/v, m/m);
- podczas badań stosowano linię komórkową wyprowadzoną z ludzkich zarodkowych komórek nerki, które wyprowadzono z komórek nerki płodu poddanego aborcji. Osobiście, uwzględniając pewne aspekty etyczne i moralne nie stosowałbym takiej linii komórkowej. Z pewnością można by zastosować inną linię komórkową, wyprowadzoną z komórek zwierzęcych lub pozyskaną poprzez pobranie od dawcy w inny sposób;
- na str. 51, Doktorantka stwierdza „Mikroskop konfokalny został opisany jako pierwszy w 1940 roku przez Hansa Goldmann’a, a opatentowany ...”, uważam, że powinno zostać użyte sformułowanie „został skonstruowany” zamiast „opisany”. W pierwszym akapicie tej strony Autorka napisała również, że w mikroskopii konfokalnej wykorzystuje się laser jako źródło światła, natomiast pierwszy aparat skonstruowano w 1940 roku, jednak wówczas nie były znane laserowe źródła światła;
- w rozdziale „Metody” przedstawiono „Materiał 2: Odbitki polimerowe matryc Si-Au”. Dlaczego nie opisano materiału 1?
- podczas otrzymywania materiału 2 w procesie „odciskania wzoru” z zastosowaniem polikaprolaktanu i płytek krzemowo-złoty stosowano siłę 1 T. Domyślam się, że prawdopodobnie powinno być 1 t (tonę), jednak jednostką siły jest 1 N;

- w całym rozdziale „Materiały i metody”, poza ważniejszymi podrozdziałami brak numeracji pozostałych mniejszych podrozdziałów;
- we wzorach na str. 62 nie zostały objaśnione stosowane symbole;
- Doktorantka w podrozdziale 3.2.10. używa określenia „skan Lambda wzdłuż długości fali”. Określenie to jest dość niejasne. Rozumiem, że dotyczy to analizy maksimów emisji fluorescencji w funkcji długości fali;
- w podrozdziale 3.2.12. stosowano określenie „Następnie próby przemyte zostały...” określenie „próby” powinno zostać zastąpione odpowiedniejszym terminem „próbki”. Skład płynu elucyjnego nie jest sprecyzowany 0,1% kwasu mrówkowego w 90% acetonitrylu (jakiego „typu” jest stężenie procentowe m/m, v/v, m/v?).

Kolejny rozdział to „Wyniki badań” liczący 116 stron. Jest to najobszerniejsza część pracy. Rozdział rozpoczyna się krótką charakterystyką nośników stosowanych podczas badań, przechodzącą stopniowo w część biologiczną dotyczącą wpływu stosowanego podłoża na wzrost linii komórkowych. Ta część pracy jest bogato ilustrowana obrazami otrzymanymi z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego, w tym wynikami analiz immunocytochemicznych. Autorka podaje także w postaci tabelaryzowanej wyniki badań dotyczące wpływu topografii stosowanych nośników komórek na ekspresję określonych markerów oraz kształt komórek. Rozdział ten, jak już wspomniałem jest wprost „przesycony” wynikami badań z dość lakonicznym komentarzem poszczególnych wyników.

- na rycinach 4-6, 4-7, 4-8, 4-9 Doktorantka używa błędnego określenia „profile widma intensywności fluorescencji...”, użycie określenie „widma fluorescencji” byłoby wystarczające. Ponadto w opisie tych widm (str. 125) użyte są dość niezrozumiałe sformułowania: „Rycina 4-6 przedstawia widma żółtej i czerwonej emisji komórek hodowanych na matrycach...” „Rycina 4-7 przedstawia widma żółtej i czerwonej emisji komórek hodowanych na matrycach...” „Rycina 4-8 przedstawia widma zielonej i fioletowej emisji komórek ...” itd. Oczywiście Autorka pracy powinna użyć terminu „emisji fluorescencji”, a nie „emisji komórek”;
- podobnie jak w poprzednich rozdziałach brak tutaj numeracji podrozdziałów, co skutkuje pewnym zaburzeniem układu pracy;
- rysunki (ryciny) ilustrujące wyniki poszczególnych badań są bardzo zróżnicowane pod względem graficznym. Na wykresach zamieszczane są niepotrzebne informacje w postaci nagłówek, które np. w przypadku ryc. 4-18, 4-19, 4-20, 4-21 oraz wielu innych powinny zostać zamieszczone pod osią X. Ryciny powinny zostać możliwie uproszczone i znormalizowane pod względem graficznym. Niektóre, zwłaszcza wykresy kołowe nie są zbyt czytelne (4-29, 4-32, 4-37). Tabele 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13 różnią się natomiast pod względem graficznym od pozostałych tabel w pracy (wprowadza to pewien nieporządek). Niedopuszczalne jest natomiast stosowanie połączeń schemat-tabela i nazywanie tego Tabelą (Tabela 4-15, 4-16, 4-17, 4-18, 4-19). W opisie tych „tworów graficznych” Autorka napisała np. „Tabela 4-15. Schemat (A) oraz tabela (B) przedstawiająca...” Należałoby tutaj rozdzielić schemat od tabeli;
- niektóre zdania wymagają także korekty językowej: zdanie ze strony 148: „Genów białek, które są zaangażowane w neurogenezę, występowało 163, z czego 154 uznano jako biorące udział w różnicowaniu w stronę neuronów, a 13 w różnicowaniu w stronę gleju”; zdanie ze strony 149: „Genów białek związanych z wytwarzaniem wypustek komórkowych zostało 74 zidentyfikowanych, natomiast białek zaangażowanych w migrację komórek 92”; zdanie ze strony 159: „Białek skatalogowanych jako biorących udział w różnicowaniu neuronów występowało 98, a w procesach rozwoju neuronów 149. Białka zaangażowane w neurogenezę występowało 160, a w glikogenezę 29”; zdanie ze strony 163 będące opisem Ryciny 4-38: „Obraz rozkładu białek zaangażowanych w wybrane procesy biologiczne w komórkach NCS hodowanych na podłożach o wzorze 5 μ m”;
- w tabeli 4-20 nie podano piśmiennictwa przy opisie funkcji białek kodowanych przez geny *CLU* oraz *SMARCA4*.

Kolejną częścią pracy jest rozdział „Dyskusja” licząca 19 stron. Pierwsze trzy karty tego rozdziału przypominają pod względem redakcyjnym „Wstęp” pracy. Autorka ponownie nawiązuje

do tematyki nanomateriałów, medycyny regeneracyjnej, wybranych typów komórek, typów stosowanych podłoży, metod badania wzrostu komórek. Uważam, że ta część pracy nie powinna znaleźć się w tym miejscu, a zostać wkomponowana we „Wstęp” rozprawy doktorskiej. Pierwsze trzy strony rozdziału podzielone zostały podobnie jak poprzednio bez numeracji podrozdziałów (stosowane są jedynie wyłuszczenia „podrozdziałów-haseł”). W pierwszym numerowanym podrozdziale 5.1. „Matryce krzemowo-złote”, podrozdziale 5.2. „Odbitki polimerowe” oraz 5.3. „Matryce o zmiennym współczynniku proporcji” (stanowiących ok. 50% objętości rozdziału „Dyskusja”), Doktorantka przedstawia jedynie opis wyników badań pozbawiony dyskusji. Potwierdzeniem tego jest sporadyczne cytowanie jedynie czterech pozycji literaturowych (np. str. 194-197 nie zawierają żadnego odnośnika do piśmiennictwa). Nienumerowany podrozdział „Analiza proteomów neuralnych komórek macierzystych hodowanych na badanych podłożach” zawiera już elementy dyskusji, typowe dla prac badawczych. Przedstawiono tutaj wyniki badań dotyczące analizy białek pojawiających się w miarę wzrostu i rozwoju komórek macierzystych (w 7 i 14 dniu inkubacji). Kolejny podrozdział „Dyskusji” to 5.4. zatytułowany „Wpływ topografii powierzchni na wzrost i różnicowanie NSC”. Niestety, trochę szkoda że właśnie ta część dyskusji stanowi tylko 1 stronę z 235 stron pracy, a przecież nawiązuje do tytułu rozprawy doktorskiej!

W rozdziale 6 „Podsumowanie wyników” Doktorantka w sposób zwięzły podsumowuje wpływ każdego ze stosowanych nośników (matryce krzemowo-złote, odbitki polimerowe otrzymane z użyciem matryc krzemowo-złotych oraz matryce krzemowe o zmiennym współczynniku proporcji) na proces różnicowania komórek, który to analizowany był z użyciem mikroskopii optycznej, SEM, AFM (morfologia komórek) oraz metod immunocytochemicznych i analizy proteomu (stosowane jako narzędzia do analizy szeroko pojętej aktywności życiowej komórek). Następnie Autorka rozprawy przechodzi do „Wniosków” ujętych w kilku punktach, wskazując na najbardziej optymalne podłoża do ukierunkowanego wzrostu i rozwoju komórek.

Ostatnią część pracy stanowi „Bibliografia” obejmująca 180 pozycji literaturowych. Niestety, nawet w tej części pracy dopatrzyłem się pewnych uchybień natury redakcyjnej. W spisie cytowanego piśmiennictwa Doktorantka podaje skrócone nazwy czasopism, które prawdopodobnie miały być zgodne z CAS, jednak w skrótach literowych zabrakło kropek (*Biochem J.*, *J Biomed Mater Res – Part A*, *J Biol Chem.*, itd.).

Pomimo dość krytycznej recenzji przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, wynikającej głównie z jej opracowania redakcyjnego uważam, że może ona stanowić cenne dane wyjściowe do opracowania artykułu naukowego. Treść samej rozprawy, zwłaszcza jej część doświadczalna jest obszerna i świadczy o znacznej ilości czasu poświęconego w wykonanie badań. Praca byłaby zdecydowanie lepiej odebrana gdyby była opracowana nieco staranniej, a wyniki lepiej przedyskutowane, nawet kosztem mniejszej „ilości” zaprezentowanych wyników. Kończąc moją ocenę podkreślam, że cel pracy, poprzez wykonane badania, interpretację wyników oraz wyciągnięte wnioski został osiągnięty.

4. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Jagody Dominiki Litowczenko-Cybulskiej zatytułowana „*Wpływ topografii (nano)materiałów na zachowanie ludzkich komórek neuralnych*” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Moritz