

dr hab. Wojciech Kałas  
wojciech.kalas@hirszfeld.pl  
Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Rudolfa Weigla 12  
53-114 Wrocław



Kunice, 6 maja 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Jagody Dominiki Litowczenko-Cybulskiej  
pod tytułem**

***„Wpływ topografii nanomateriałów na zachowanie ludzkich komórek neuralnych”***

Przedstawiona do recenzji praca Pani Jagody Dominiki Litowczenko-Cybulskiej pod tytułem „Wpływ topografii nanomateriałów na zachowanie ludzkich komórek neuralnych” została wykonana w Centrum NanoBioMedycznym oraz Zakładzie Wirusologii Molekularnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i opisuje próbę indukcji ukierunkowanego wzrostu i różnicowania macierzystych komórek neuralnych poprzez hodowlę na podłożach o unikalnej geometrii. Poruszone przez Doktorantkę zagadnienia są interesujące a zaprezentowane badania dostarczają wielu cennych informacji. W przedstawionej pracy Doktorantka obserwowała charakterystyczne zmiany morfologii macierzystych komórek neuralnych i określała zmiany globalnej ekspresji białek na podłożach, które różniły się jedynie topografią. Moim zdaniem, jest to temat fascynujący dlatego, że większość z nas badaczy traktuje dno płytki hodowlanej jako element o niewielkim znaczeniu dla wyników przeprowadzonych doświadczeń. Tym bardziej należy docenić przytoczone w rozprawie badania własne pokazujące ekspresję markerów różnicowania komórek neuralnych w kierunku astrocytów, oligodendrocytów czy neuronów indukowaną topografią podłoża. Zaobserwowano różną konstelację markerów towarzyszących wzrostowi i różnicowaniu komórek na podłożach o wąskich rowkach o średnicy około 1  $\mu\text{m}$  lub na podłożach o większych rowkach o średnicach 5  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$ . Co więcej, komórki neuronalne hodowane na rowkach 1  $\mu\text{m}$  miały ekspresję markerów wskazującą na różnicowanie raczej w kierunku neuronów, podczas gdy komórki hodowane na pozostałych matrycach miały inne markery różnicowania. Pokazuje to dramatyczny wpływ geometrii podłoża na różnicowanie komórek. Pomimo rosnącej liczby publikacji poruszających te zagadnienia uważam, że potencjał materiałów o różnej topografii pozostaje nieodkryty i niewykorzystany.

W swojej pracy Doktorantka wykorzystała szeroką gamę trudnych metod biologii molekularnej: mikroskopię elektronową, mikroskopię sił atomowych, mikroskopię konfokalną. Zostały one uzupełnione analizą proteomiczną opartą na chromatografii cieczowej w tandemie ze spektrometrią mas. Jest to unikalny warsztat w biologii molekularnej i może stanowić podstawę wielu interesujących badań w przyszłości.

Omawiana rozprawa doktorska ma klasyczny układ i składa się z rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki Badań, Dyskusja, niemalże 5-cio stronicowego Podsumowania Wyników, i Wniosków. Dodatkowo zamieszczono zwyczajową Bibliografię a także spisy: ilustracji, fotografii i tabel. Całość pracy składa się z 235 stron tekstu, mikrofotografii i tabel.

W 30-sto stronicowym **Wstępie** Doktorantka przedstawia informacje dotyczące komórek macierzystych. Szczególnie szeroko został potraktowany temat neurogenezy i biomarkerów różnicowania. Moim zdaniem, poważnym mankamentem Wstępu jest brak przeglądu literatury dotyczącej przedmiotu pracy, którym jest wpływ topografii dna naczynia hodowlanego na wzrost i różnicowanie komórek. Wystarczy wspomnieć, że Autorka zacytowała w tej mierze jedynie kilka publikacji. Co więcej w bibliografii nie znalazłem pozycji dotyczących podłużnych linii, czyli wzorów jakimi zajmowała się Doktorantka. Nie mogę tego stwierdzić z całą pewnością, ponieważ numeracja bibliografii jest w wielu miejscach błędna. Na przykład, na stronie 9, po zdaniu dotyczącym m.in. nanorowków i ukierunkowanego wzrostu cytowana jest praca dotycząca powierzchni o strukturze, która nie preferuje wzrostu w żadnym z kierunków. Co więcej, wzór ten nie został otrzymany metodą bottom-up, ani nie ma niskiej temperatury zeszklenia, zatem nie może służyć jako referencja w kolejnych akapitach.

**Cel Pracy** został sformułowany w bardzo ogólny sposób jako *"Zbadanie wzrostu (...) neuralnych komórek macierzystych na różnych typach podłoża o określonej topografii"*. Przytoczona poniżej 9 punktowa lista, nie jest listą szczegółowych celów, tez czy pytań często przytaczanych w tym miejscu, a jedynie przedstawieniem czynności od których rozpoczęto realizację pracy. Moje wątpliwości budzą zwłaszcza dwa punkty, które dotyczą projektowania wzorów. W tekście rozprawy na temat projektowania wzorów zostały umieszczone dwa podobne w swej wymowie zdania, na stronach 38 i 193: Jedno z nich brzmi: *"Wzory o zróżnicowanej topografii powierzchni zaprojektowano w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe"*. Stwierdzenie to nie zostało opatrzone żadnym odnośnikiem do literatury przedmiotu.

1. Proszę o wskazanie literatury jaką się Pani kierowała i przedstawienie rozumowania prowadzącego do wyboru wzorów użytych w Pani pracy doktorskiej.

Moim zdaniem, ogólne sformułowanie celu pracy jest przeszkodą, z której wynikają niedostatki opisu wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków.

W rozdziale zatytułowanym **Materiały i Metody** Doktorantka zawarła spis użytych materiałów i przytoczyła encyklopedyczne informacje na temat użytych metod. Wyjątkowo obszernie zostały potraktowane metody mikroskopowe, gdzie opisano rys historyczny, zasadę działania oraz budowę instrumentów. Jednak, z punktu widzenia eksperymentatora, rozdział ten został napisany niedbale. W spisach brakuje odczynników i materiałów związanych z hodowlą komórkową, mediów hodowlanych, ich suplementów, antybiotyków, czynników wzrostowych, roztworu fibronektyny. Informacje dotyczące naczyń hodowlanych są bardzo skąpe i pojawia się pojęcie płytki wielodołkowej. W rozprawie dotyczącej wpływu powierzchni, na której hodzi się komórki na ich wzrost, budzi to szczególny niepokój. Procedury stosowane przez Doktorantkę zostały opisane ogólnikowo lub pominięte (np. barwienie f-aktyny); a przecież, w swoim zamyśle, rozdział ten ma służyć jako źródło informacji dla osób zainteresowanych przeprowadzeniem podobnych badań. Zdanie ze strony 59: *"... dodawano odpowiednią (jaką?) ilość kompletnej pożywki hodowlanej (jakiej?, czym uzupełnionej?) oraz posiewano zawiesinę komórek macierzystych (jakich dokładnie?) w odpowiedniej ilości (czyli jakiej?) na wybrane matryce hodowlane"* jest rażącym przykładem unikania konkretnych informacji. Niestety, nie odosobnionym. Autorka nie uniknęła powtórzeń. Rozdział zawiera dwa bliźniacze podrozdziały dotyczące hodowli komórek w standardowych naczyniach i na badanych podłożach, które zawierają w 90% identyczne informacje dotyczące medium hodowlanego i pasażowania komórek. Przy opisie „trypsynizacji” komórek Autorka stosuje odnośnik do podrozdziału 3.2.2 - dotyczącego



pomiaru kąta zwilżania matryc. Podobnie nie uzupełniono nazwy zestawu do wykrywania mykoplazmy na stronie 57.

Do tego rozdziału mam następujące pytania merytoryczne:

2. Czy charakterystyka fizyczna badanych przez Panią powierzchni była przeprowadzana na nieopłaszczonych powierzchniach świeżo po syntezie czy na powierzchniach po opłaszczaniu fibronektyną lub roztworem CellStart? Jak przygotowanie powierzchni do hodowli komórkowej wpływa na wyrazistość wzorów? Czy i w jakim stopniu mogą one ulegać wypełnieniu przez fibronektynę lub białka macierzy komórkowej z roztworu CellStart?

Najdłuższym, bo ponad 110 stronicowym, rozdziałem pracy są **Wyniki Badań**. Z jednej strony ilustruje to ogrom materiału badawczego zgromadzonego przez Doktorantkę. Z drugiej jednak, jest to konsekwencją kronikarskiego sposobu przedstawiania wyników, kolejno stosowanymi metodami. Odzwierciedlone jest to przez tytuły poszczególnych podrozdziałów: Immunocytochemia, Proteomika itp. Sposób ten bardzo utrudnia późniejszą syntezę wyników i udzielenie przekrojowej odpowiedzi na pytanie postawione w celu pracy: Jak rosły neuralne komórki macierzyste na podłożach o różnej topografii? Dużym mankamentem jest opisowa nomenklatura zastosowanych materiałów. Przeszkadza ona w zrozumieniu rozprawy podczas czytania. Przebadano 5 różnych materiałów. Otrzymały one nazwy: 1. matryce krzemowo-złote, zwane czasem kompozytowymi matrycami krzemowo-złotymi; 2. odbitki\pieczętki polimerowe matryc krzemowo złotych; materiały te często były określane jako *"matryce krzemowo złote o zróżnicowanej topografii powierzchni"* - co jest mylące, ponieważ stosowano matryce o tylko jednym wzorze; ostatnie 3 materiały o (3-5) to matryce krzemowe o zmiennym współczynniku proporcji wynoszącym 80, 42 lub 30, ale nazywane matrycami o wzorach 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$ .

Do tych generalnych uwag dodam jeszcze kilka szczegółowych i proszę by Doktorantka się do nich odniosła w swojej odpowiedzi.

3. Na stronach 75/76 napisano: *„Nie stwierdzono wzrostu komórek neuroblastomy na płaskich podłożach polimerowych oraz podłożach polimerowych o zróżnicowanej topografii powierzchni. Prawdopodobnie przyczyną była stopniowa degradacja polimeru w medium komórkowym ...”*. Co zatem zostało poddane analizie w doświadczeniach, których wyniki przedstawiono na Rycinie 4.4, Fotografii 4.6-3, Fotografii 4.7-1, a zwłaszcza na Rycinie 4-11, gdzie pokazany jest rozkład długości oraz kątów rozłożenia neurytów komórek rosnących na podłożu polimerowym?

4. W tabeli tabeli 4-4 podsumowała Pani wyniki z mikroskopii konfokalnej. W podpisie wyjaśniono, że znakiem „+” oznaczono obecność markera, „-” jego brak, natomiast strzałkami obniżenie lub podwyższenie ekspresji. Z tabeli dowiadujemy się, że po siedmiu dniach hodowli na podłożach kontrolnych nie zaobserwowano ekspresji markerów GALC i SYP. Po czternastu dniach zaobserwowano już obecność białek GALC i SYP. Jednak obok znaku „+” znaku strzałką w dół wskazano na obniżenie ekspresji białek GALC i SYP. Proszę wyjaśnić względem czego ekspresja białek GALC i SYP została obniżona w próbie kontrolnej?

5. Podobnie z białkiem MAP2. Marker ten był oznaczany po raz pierwszy po 7 dniach. Był on nieobecny w komórkach hodowanych na podłożach kontrolnych, ale był wykryty na pozostałych badanych podłożach. Tu również wskazano, że ekspresja tego markera wzrosła na matrycach o wzorach 5  $\mu\text{m}$  i 1  $\mu\text{m}$ , lub zmalała na matrycy o wzorze 10  $\mu\text{m}$ . Proszę wyjaśnić względem czego ekspresja białka MAP2 wzrosła lub została obniżona w tych próbkach?

W następnym podrozdziale 4.8 przedstawiono wyniki ilościowej analizy intensywności fluorescencji w poszczególnych próbek. Konfrontacja otrzymanych wykresów z tabelą 4-4 wskazuje na niekonsekwencję w analizie wyników doświadczeń. I przykład, do którego proszę się odnieść:

6. Intensywność fluorescencji dla markera GALC na rycinie 4-6 waha się w okolicach 12 jednostek. W tabeli zostało to zinterpretowane jako obecność markera. Natomiast na rycinie !! intensywność świecenia markera DCX na matrycy 1  $\mu\text{m}$  o wartości ok. 50 zostało zinterpretowane jako brak ekspresji. Proszę uzasadnić taką interpretację wyników.

7. Pomimo, że mikroskopowe analizy immunocytochemiczne nie są metodami ilościowymi Doktorantka nie ustrzegła się stwierdzeń porównawczych (np. na stronie 195). W dodatku porównywany jest sygnał otrzymywany za pomocą różnych przeciwciał, zaopatrzonych w różne fluorochromy. Moim zdaniem jest to błąd metodologiczny. Proszę obronić swój punkt widzenia lub wyjaśnić dlaczego jest to błędem.

W podrozdziale 4.9 przedstawiono analizę statystyczną neurytów. Przedstawiono średnie długości - bez odchyłeń standardowych, histogramy długości oraz histogramy kąta ułożenia. Nie jest również jasne jak był definiowany kąt 0 st. Moim zdaniem dane byłyby klarowniejsze, gdyby były przedstawione jako wartość bezwzględna odchylenia od osi wzoru. Wszak jest nam poniekąd obojętne czy komórki odchylają się na prawo czy lewo.

8. Czy na otrzymanych danych przeprowadzono test statystyczny, który by wskazywał czy wykryte różnice w rozkładach są istotne statystycznie?

Dużą część rozdziału wyniki stanowi prezentacja danych z badań proteomicznych uzyskanych po 7 i 14 dniach hodowli na matrycach krzemowych. Muszę powiedzieć, że jest to istotna część pracy, gdzie Doktorantka musiała się zmierzyć z niełatwym zadaniem analizy danych metodami bioinformatycznymi. Bardzo spodobał mi się pomysł użycia narzędzia do klasyfikacji genów do analizy danych proteomicznych. Niestety, w konsekwencji, Autorka opisując wyniki swoich analiz proteomicznych nagminnie pisze o genach, co moim zdaniem, jest błędem. To białka zostały poddane analizie i tak konsekwentnie powinny być opisywane wyniki.

9. Na stronie 148 w w odniesieniu do analiz proteomicznych mowa o próbie referencyjnej. Proszę wyjaśnić co było tą próbą referencyjną?

10. W wielu miejscach m.in. w opisie tabeli 4-4 napisano, że jako podłoża kontrolnego użyto szkła. O jakie szkło chodzi?

Nie mogę przemilczeć zastrzeżeń co do sposobu graficznej prezentacji wyników. Brak jest jednolitego wzorca rysunków czy też tabel. Dodatkową przeszkodą w interpretacji wyników jest to, że wykresy czy fotografie nagminnie są przedstawiane w innej skali. Np. na fotografii 4.1-3 przedstawiono 3 profile AFM, każdy w innej skali. Utrudnia to wyobrażenie sobie topografii matryc. Barwienia immunochemiczne przedstawiane są w skalach od 20  $\mu\text{m}$  do 100  $\mu\text{m}$ , nawet na pojedynczym rysunku.

Uzyskane wyniki zostały podsumowane w **Dyskusji**. W tym rozdziale Autorka przedstawiła spójny tok rozumowania, który przyświecał wykonywanym eksperymentom. Szkoda, że kolejność prezentacji i opisywania wyników nie odzwierciedla tego toku rozumowania. Moim zdaniem, jest to poważna przeszkoda w rozumieniu pracy w trakcie czytania. Wiele stwierdzeń dyskusji nie jest poparte odnośnikami do literatury lub lub poparte odnośnikami, które są błędne. Na przykład, na stronie 187 napisano: „Wiele danych literaturowych, wskazuje również na możliwość różnicowania komórek neuroblastomy za pomocą odpowiednio dobranych podłoży.” Towarzyszy temu tylko jedna, błędna referencja. W stosunku do tego rozdziału mam 3 pytania:



11. W Dyskusji na stronie 193 materiał 1 - martyce krzemowo złote - jest określany jako matryce krzemowe. Czy chemicznie jest to ten sam materiał co materiały 3, 4 i 5? Jeśli tak, dlaczego nie jest jasno wskazane w rozdziale wyniki?

12. Jaka wyglądała ekspresja markerów badanych metodami immunocytochemicznymi: OLIG2, GALC, DCX, MAP2, SYP, SOX i NES w analizie proteomicznej? Czy zaobserwowano zgodność pomiędzy wynikami otrzymanymi tymi dwoma metodami? Jeśli nie, to jakie mogą być tego przyczyny?

13. Z lektury rozprawy wnioskuję, że swoją pracę Doktorantka umieszcza w dziedzinie medycyny regeneracyjnej i rusztowań komórkowych. Nie mogę pozbyć się wrażenia, że jest to mocno na wyrost ponieważ model badawczy (monokultura komórek *in vitro*, na płaskich podłożach) jest daleki od kontekstu medycyny regeneracyjnej. Jakie widzi Pani zastosowanie, poza poznawczym, dla kultur na płaskich podłożach?

Merytoryczną część pracy kończą **Podsumowanie Wyników i Wnioski**, w których Doktorantka przytacza, w miarę skrótovej formie, otrzymane wyniki i wyciąga wnioski. Wyciągnięte wnioski uważam za uzasadnione i w znakomitej większości poparte otrzymanymi wynikami. Należy pochwalić wstrzeźliwość w formułowaniu górnolotnych, ale niepopartych wynikami wniosków. Moje jedyne zastrzeżenia kieruję pod adresem stwierdzeń odwołujących się do braku toksyczności. W pracy nie przedstawiono wyników, żadnego specyficznego testu na proliferację, śmierć komórki czy apoptozę. Moim zdaniem, pośrednie obserwacje, czy też fakt, że komórki rosły przez 7, 14 lub 21 dni na danym podłożu nie uzasadnia stwierdzenia, że jest ono zupełnie nietoksyczne, a tym bardziej optymalne.

Treści przedstawione w pracy zostały w sposób dostateczny poparte 180 pozycjami aktualnej **Bibliografii**. Na pewno dobór literatury mógłby być lepszy, a referencje rzetelniej cytowane w treści pracy. Pozostaje mi jedynie polecić używanie darmowych czy komercyjnych dodatków do programów tekstowych, które są nieocenioną pomocą w posługiwaniu się dużą bazą literatury.

Uwagi swoje uważam za ważne i proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do numerowanych pytań i uwag. W większości dotyczą one jednak niedostatków prezentacji wyników. Pomocą mogłaby tu być drastyczna selekcja wyników. Blaise Pascal miał powiedzieć kiedyś: „Napisałem długi list, ponieważ nie miałem czasu zrobić go krótszym”.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa demonstruje umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę. Zawiera ona interesujące i unikalne wyniki badań otrzymane wieloma trudnymi metodami biologicznymi opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Z tych względów pracę oceniam pozytywnie i stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim wyrażone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. "O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki".

Z wyrazami szacunku

