INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Dr hab. Barbara Gawrońska-Kozak
Profesor nadzwyczajny
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
e-mail: b.kozak@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 27 października 2017r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pana mgr Sławomira Lasoty**

Pt. "**Rola dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3**"

wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Zbigniewa Madei (promotor)

w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Migracja komórek jest zjawiskiem nieodzownie związanym z procesami fizjologicznymi jak i patologicznymi zachodzącymi w organizmie. Proces rozwoju/wzrostu organizmu, ciągła wymiana komórek w trakcie życia osobniczego, a także zachodzące procesy naprawcze uszkodzonych tkanek i organów są ściśle połączone ze zjawiskiem migracji komórkowej. Reakcje ruchowe komórek, tzw. taksje, mogą być sklasyfikowane w zależności od rodzaju bodźca kierunkowego. Wśród nich możemy wyróżnić między innymi: chemotaksje (bodziec chemiczny), fototaksje (światło), termotaksje (ciepło), tigmotaksje (dotyk) oraz elektrotaksje/galwanotaksje wywołane bodźcem elektrycznym.

Niemiecki fizjolog Emil Du-Bois Reymond 150 lat temu zaobserwował i po raz pierwszy zmierzył obecność endogennego pola elektrycznego wytwarzanego przez organizm w odpowiedzi na uraz

skóry. Dało to podstawę i początek badaniom nad wytwarzaniem sygnałów elektrycznych przez organizm oraz zjawisku elektrotaksji, czyli ukierunkowanej odpowiedzi/migracji komórek w tymże polu elektrycznym. Badania ostatnich lat wykazały, iż właściwości i charakter wytworzonego pola mogą decydować o wyniku zachodzącego procesu, jak to zaobserwowano w przypadku gojenia regeneracyjnego vs reparacyjnego (naprawczego). Ponadto, wykazano również, że obniżone natężenie pola elektrycznego w zranionej skórze czy rogówce osobników z zaburzeniami cukrzycowymi może być odpowiedzialne za niegojące się rany. Powyższe przykłady będące jednymi z wielu, obrazują jak istotne jest poznanie mechanizmów wytwarzania, detekcji oraz migracji komórek w polu elektrycznym.

Generalnie, lokalne pola elektryczne w organizmie badane są w dwóch aspektach: procesu ich wytwarzania oraz odpowiedzi komórek na ich obecność oraz zmianę. Rozpoznanie maszynerii molekularnej, dzięki której komórki odbierają i odpowiadają na bodziec elektryczny, a w przyszłości możliwość ukierunkowanej regulacji elektrotaktycznych właściwości komórek jest jednym z wyzwań biologii molekularnej. W tym kontekście przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Sławomira Lasoty wpisuje się w główny nurt badań nad zjawiskiem elektrotaksji. Doktorant w swojej dysertacji podjął się niezwykle trudnego zadania zbadania dynamiki reakcji, wrażliwości oraz mechanizmów odpowiedzialnych za percepcję i odpowiedź komórkową fibroblastów mysich na fizjologiczne zmiany pól elektrycznych.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona praca doktorska liczy 141 stron i zachowuje typowy dla rozpraw doktorskich układ. Rozprawa rozpoczyna się wykazem skrótów (1 strona) oraz streszczeniem w języku polskim (3 strony) i angielskim (2 strony). Wstęp liczy 20 stron i zawiera 1 rycinę. Cel pracy stanowi 1 stronę. Bezpośrednio po nim następujący rozdział Materiały i Metody obejmujący 21 stron i zawierający 7 tabel oraz 3 ryciny. Rozdział Wyniki liczy 47 stron, na których umieszczono 28 rycin, 10 tabel oraz dołączono 8 filmów. Dyskusja obejmuje 23 strony, po których następuje Podsumowanie stanowiące 2 strony. Suplementem rozprawy doktorskiej są dołączone na płycie DVD filmy z obserwacji mikroskopowych, których legenda stanowi 1 stronę. Rozprawę doktorską zamyka rozdział Bibliografia obejmujący 166 pozycji piśmiennictwa.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszelkie wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, jest informatywne i przedstawia w formie skrótowej cele oraz najważniejsze wyniki pracy wraz z podsumowaniem.

Wstęp pracy w sposób usystematyzowany oraz wyczerpujący omawia poszczególne i dotychczas poznane aspekty endogennych pól elektrycznych. Zastosowany przez Doktoranta we wstępie podział na podrozdziały pozwala na systematyczne, oparte na najnowszej literaturze zaznajomienie się z aktualnym stanem wiedzy. Logiczny układ wiedzy począwszy od migracji komórek i jej znaczenia dla procesów fizjologicznych i patologicznych, poprzez charakterystykę istniejących endogennych pól elektrycznych, po proponowane mechanizmy komórkowej detekcji oraz wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne pozwala na stopniowe zapoznanie ze złożonością procesów elektrotaktycznych. Ponadto, Doktorant już we wstępie opierając się na obszernych danych bibliograficznych zwraca uwagę na aspekty, które dotychczas nie zostały poznane lub budzą kontrowersje, sygnalizując potrzebę, kierunek i logikę podjętych przez Niego badań.

Podsumowując, Wstęp jest przygotowany bardzo starannie. Załączona Rycina 1 obrazująca mechanizm powstawania endogennych pól elektrycznych na przykładzie skóry klarownie wyjaśnia złożoność procesu. Ponadto, układ informacji zawarty we wstępie w sposób logiczny wprowadza czytelnika w cele badawcze jakie Doktorant postawił w swojej pracy doktorskiej.

Uwagi:

1. Regeneracja vs reparacja str 14 wiersz 21. Zjawisko regeneracji i reparacji to dwa zjawiska, których celem jest gojenie urazów, jednakże efekt tych procesów jest odmienny. Efektem procesu reparacji, czyli gojenia naprawczego jest blizna, struktura która przywraca ciągłość uszkodzonych tkanek, jednak w zależności od wielkości urazu często nie jest w stanie odtworzyć funkcjonalności/budowy przedurazowej tkanek. Natomiast proces regeneracji odtwarza uszkodzone bądź utracone tkanki/narządy odbudowując ich architekturę i funkcjonalność identyczną jak przed urazem. Dlatego też w zdaniu bardziej odpowiednim byłoby użycie „gojenie urazu skórnego" zgodnie z tytułem cytowanej pracy, a terminologia ta jest wspólna zarówno dla reparacji jak i regeneracji.
   Podobnie str. 16 wiersz 26. Adekwatnym do cytowanej literatury byłoby użycie „komórki zaangażowane w proces gojenia urazów skóry".

2. Str 14 wiersz 31. Metody leczenia urazów skórnych stosowane powszechnie można raczej nazwać konwencjonalnymi, a nie alternatywnymi. Wydaje się, że słowo „alternatywne" bądź „nowatorskie" bardziej odpowiada zastosowaniu urządzenia WoundEL®.
3. Str 15 wiersz pierwszy: powinno być „transepitelialne"
4. Str. 21 wiersz pierwszy: wskazanym byłoby podanie pełnej nazwy EGTA oraz krótkiej informacji wykazującej celowość użycia tego związku w badaniach.
5. Str 25 wiersz jedenasty: słowo „persystencja" jest dosłownym przeniesieniem z j. angielskiego. Ponieważ rozprawa doktorska jest napisana w jezyku polskim dobrze byłoby znaleźć adekwatny odpowiednik.

Główny ***Cel pracy*** wynikający logicznie z poprzedzającego wstępu został sformułowany klarownie. Przedstawiony jako wprowadzenie do celu pracy, opis istniejących hipotez dotyczących wyjaśnienia mechanizmu reakcji komórki na pole elektryczne uzasadnia następujące, szczegółowe cele pracy.

W sekcji ***Materiały i metody*** Doktorant w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący opisał zastosowany układ badawczy, jak i procedury eksperymentalne zastosowane w pracy.

Uwagi:

1. W rozdziale dotyczącym analiz Western-Blot brak informacji dotyczącej źródła pochodzenia przeciwciała anti-KCNJ15. Czy są to te same przeciwciała, które zastosowano w barwieniach immunofluorescencyjnych?

Wyniki

Rezultaty badań zostały przedstawione w rozdziale Wyniki składającym się z 5 podrozdziałów, z których czwarty i piąty rozbudowane są w sposób hierarchiczny. Każdy z podrozdziałów Wyników poprzedzony jest krótkim wstępem przedstawiającym aktualny stan wiedzy w danym obszarze i uzasadniającym podjęcie badań z jasno określonym kierunkiem.

W Pierwszym rozdziale została scharakteryzowana aktywność elektrotaktyczna fibroblastów Swiss 3T3. Wykazano, iż fibroblasty przemieszczają się w kierunku katody, a ich ruch został scharakteryzowany w zależności od zastosowanego natężenia pola elektrycznego. Rozdział Drugi dotyczy analizy zmian morfologicznych: wydłużenia i orientacji komórek Swiss 3T3, które zachodzą w trakcie kierunkowej migracji w polu elektrycznym. Dynamika reakcji fibroblastów 3T3

na zastosowane pole elektryczne, jak również na odwrócenie jego kierunku, została przeanalizowana w rozdziale Trzecim. Przeanalizowane zmiany morfologiczne migrujących komórek w połączeniu z analizą zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego wykazały szybką, w obrębie 1 min, reakcję. Wyniki te wskazały Doktorantowi na poszukiwanie mechanizmu elektrotaksji w procesach uzasadniających tak szybką reakcję analizowanych komórek. Dlatego też, w następnym podrozdziale (podrozdział czwarty) szczegółowo, z zastosowaniem najnowocześniejszych metodologii został przeanalizowany udział aktywacji błonowych kanałów jonowych w recepcji sygnałów pola elektrycznego. Doktorant wykazał, iż dokomórkowe prostownicze kanały potasowe (Kir), w połączeniu z poliaminami, zaś w szczególności kanał Kir4.2, są zaangażowane w mechanizm detekcji pola elektrycznego przez fibroblasty 3T3. Na uwagę zasługuje fakt, iż udział tego mechanizmu w przypadku fibroblastów został zaobserwowany po raz pierwszy.

Analiza wewnątrzkomórkowych ścieżek przesyłania sygnału w odpowiedzi na indukcję migracyjną spowodowaną polem elektrycznym została przedstawiona w podrozdziale piątym. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują na aktywność miozyny II znajdującej się pod kontrolą kinazy ROCK w generowaniu skurczu po stronie anody oraz białka Rac 1 wraz z prawdopodobnym udziałem kinazy PI3K w proces tworzenia wypustek migracyjnych po stronie katody.

Rozdział Wyniki charakteryzuje się logicznym układem uzyskiwanych danych, jasno obrazującym kolejne etapy analiz. Interpretacja systematycznie uzyskiwanych wyników wskazuje na pragmatyczność zaprojektowania i przeprowadzenia następujących analiz. Wyniki w sposób logiczny oraz usystematyzowany przedstawiają wszystkie elementy drogi sygnału elektrycznego od analizy kierunku przemieszczania fibroblastów Swiss 3T3, poprzez analizę zmian morfologicznych, następnie mechanizmu detekcji aż do ścieżek wewnatrzkomórkowych przesyłania sygnału. Ponadto, Doktorant zobrazował zaprezentowane wyniki w znakomitej graficznej analizie wizualizacyjnej ruchu komórek Swiss 3T3 w polu elektrycznym, która dodatkowo została poparta adekwatnymi filmami.

Uwagi:

1. Odpowiednim uzupełnieniem Wyników byłoby uzasadnienie wyboru komórek Swiss 3T3 jako modelu badawczego. Takie wyjaśnienie powinno stanowić akapit rozpoczynający opis uzyskanych wyników.
2. Str. 67 wiersz 21 od góry. Wskazanym byłoby dodać informację o „posłużeniu się transfekowanymi komórkami Swiss 3T3 wytwarzającymi białko fluorescencyjne LifeAct-GFP".

3. Str. 73-74; Czy zostały przeprowadzone badania wstępne określające optymalne stężenia stosowanych analogów wewnatrzkomórkowych poliamin: putrescyny 100um i DENSPM 25 um oraz czasu ich preinkubacji z komórkami Swiss 3T3?

4. Str. 80 Rycina 21A. Uzyskane produkty reakcji Western Blot wykazujące różnice w ekspresji białka Kir4.2 w komórkach kontrolnych i po zahamowaniu genu KCNJ15 nie są przekonujące. Sugerowanym byłoby zastosowanie innego przeciwciała i/lub przeprowadzenie analizy densytometrycznej w trakcie przygotowania wyników do publikacji.

Dyskusja

W 21 stronnicowym rozdziale *Dyskusja* Doktorant krytycznie i ostrożnie ocenia uzyskane wyniki na tle danych literaturowych. Z drugiej strony umiejętnie podkreśla unikalność uzyskanych wyników, co skutkuje oczywistym brakiem możliwości ich przedyskutowania, ale zyskuje aspekt nowatorstwa tych badań w dziedzinie elektrotaksji. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt przedyskutowania/porównania wyników badań własnych do badań opartych na innych modelach komórkowych, w tym komórkach rakowych jak np. komórki raka prostaty PC3, komórki inicjujące guzy mózgu (BTICs) czy komórki raka płuc (CL1-5).

Rozprawę kończy *Podsumowanie,* które Doktorant formułuje w postaci opisowego kompendium uzyskanych wyników. Ponadto zasygnalizowane zostały kierunki dalszych badań wynikajacych z uzyskanych przez Doktoranta wyników i konsekwentnych konkluzji.

Uwagi:

Ponieważ cel pracy został jasno sformułowany w trzech zadaniach badawczych (str. 31) właściwym byłoby, dodatkowo do opisowego podsumowania, dołączenie trzech krótkich, informatywnych wniosków odpowiadających postawionym celom.

Bibliografia

Pozycja 113 wymaga podania dokładniejszych danych bibliograficznych.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca autorstwa Pana mgr Sławomira Lasoty spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Rozprawę oceniam wysoko zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Na szczególne podkreślenie zasługują celowość zastosowania nowatorskich metodologii oraz systematyczna i logiczna analiza uzyskanych wyników. Doktorant wykazał się umiejętnością prowadzenia samodzielnych badań, opanowaniem trudnego warsztatu badawczego oraz umiejętnością rozwiązywania złożonych problemów badawczych. Prezentowana praca, jej jakość, logiczność zaprojektowania toku doświadczeń, umiejętność krytycznej oceny wyników oraz ostrożne wnioskowanie wskazują jak ważnym, a może najważniejszym, jest możliwość prowadzenia badań i budowania rozpraw doktorskich w elitarnym zespole badawczym, do którego bezsprzecznie należy zespół Prof. Zbigniewa Madei.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Sławomira Lasoty, pt. "Rola dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3" spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Sławomira Lasoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Gawrońska-Kozak